

REC'D 23 MAR 2004

WIPO

PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0079897
Application Number

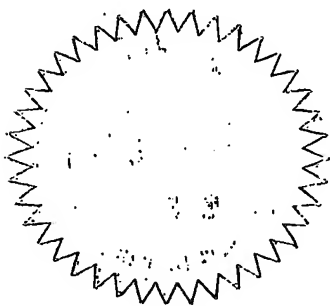
출원 년 월 일 : 2003년 11월 12일
Date of Application
NOV 12, 2003

출원인 : 학교법인 인제학원 외 2명
Applicant(s)
INJE UNIVERSITY, et al.

PRIORITY DOCUMENT

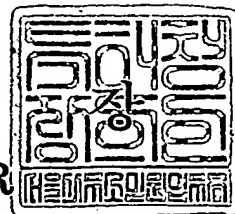
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2004 년 03 월 03 일



특 허 청

COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

	【서지사항】
【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003. 12. 23
【제출인】	
【명칭】	학교법인 인제학원
【출원인코드】	2-1999-052343-1
【사건과의 관계】	출원인
【제출인】	
【명칭】	(주)백터코어에이
【출원인코드】	1-2000-052386-1
【사건과의 관계】	출원인
【제출인】	
【명칭】	(주)에이프로젠
【출원인코드】	1-2001-037163-0
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이현실
【대리인코드】	9-1999-000366-5
【포괄위임등록번호】	2003-074484-1
【포괄위임등록번호】	2000-065198-6
【포괄위임등록번호】	2001-054600-2
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2003-074481-0
【포괄위임등록번호】	2000-065196-1
【포괄위임등록번호】	2001-054598-2
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0079897
【출원일자】	2003. 11. 12
【심사청구일자】	2003. 11. 12
【발명의 명칭】	암세포 표적성 유전자 전달방법

【제출원인】

【접수번호】 1-1-2003-0426868-78

【접수일자】 2003. 11. 12

【보정할 서류】 특허출원서

【보정할 사항】

【보정대상항목】 발명자

【보정방법】 정정

【보정내용】

【발명자】

【성명의 국문표기】 김연수

【성명의 영문표기】 KIM, Yeon-Soo

【주민등록번호】 590710-1042218

【우편번호】 137-780

【주소】 서울특별시 서초구 서초4동 1687번지 유원아파트
101동 1607 호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 소인섭

【성명의 영문표기】 SO, In Seop

【주민등록번호】 670520-1674717

【우편번호】 305-728

【주소】 대전광역시 유성구 전민동 세종아파트 101동 907호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이영관

【성명의 영문표기】 LEE, Young-Kwan

【주민등록번호】 701203-1496318

【우편번호】 305-729

【주소】 대전광역시 유성구 전민동 청구나래아파트 110동
1004호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김종필

【성명의 영문표기】 KIM, Jongpil

【주민등록번호】	700128-1117143
【우편번호】	302-748
【주소】	대전광역시 서구 월평3동 하나로아파트 107동 1205호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	강문경
【성명의 영문표기】	KANG, Moonkyung
【주민등록번호】	730118-2350315
【우편번호】	306-762
【주소】	대전광역시 대덕구 목상동 185-1 동원상록수아파트 104동 50 2호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	홍효정
【성명의 영문표기】	HONG, Hyojeong
【주민등록번호】	560612-2011112
【우편번호】	302-772
【주소】	대전광역시 서구 둔산1동 크로바아파트 117동 201호
【국적】	KR
【취지】	특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에 의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인 이현실 (인) 대리인 장성구 (인)
【수수료】	
【보정료】	0 원
【기타 수수료】	원
【합계】	0 원

	【서지사항】
【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.11.25
【제출인】	
【명칭】	학교법인 인제학원
【출원인코드】	2-1999-052343-1
【사건과의 관계】	출원인
【제출인】	
【명칭】	(주)백터코어에이
【출원인코드】	1-2000-052386-1
【사건과의 관계】	출원인
【제출인】	
【명칭】	(주)에이프로젠
【출원인코드】	1-2001-037163-0
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이현실
【대리인코드】	9-1999-000366-5
【포괄위임등록번호】	2003-074484-1
【포괄위임등록번호】	2000-065198-6
【포괄위임등록번호】	2001-054600-2
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2003-074481-0
【포괄위임등록번호】	2000-065196-1
【포괄위임등록번호】	2001-054598-2
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0079897
【출원일자】	2003.11.12
【심사청구일자】	2003.11.12
【발명의 명칭】	암세포 표적성 유전자 전달방법

【제출원인】

【발송번호】 1-5-2003-0072686-00

【발송일자】 2003.11.19

【보정할 서류】 특허출원서

【보정할 사항】

【보정대상항목】 대리인

【보정방법】 정정

【보정내용】

【대리인】

【성명】 이현실

【대리인코드】 9-1999-000366-5

【포괄위임등록번호】 2003-074484-1

【포괄위임등록번호】 2000-065198-6

【포괄위임등록번호】 2001-054600-2

【대리인】

【성명】 장성구

【대리인코드】 9-1998-000514-8

【포괄위임등록번호】 2003-074481-0

【포괄위임등록번호】 2000-065196-1

【포괄위임등록번호】 2001-054598-2

【보정할 사항】

【보정대상항목】 첨부서류

【보정방법】 제출

【보정내용】

【첨부서류】

1. 기타첨부서류[수수료 감면 서류{사업자 등록증
사본 및 원 천징수이행상황신고서 사본}]_1통

【취지】

특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규
정에의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인

이현실 (인) 대리인


장성구 (인)

【수수료】

【보정료】 11,000 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 11,000 원



1020030079897

출력 일자: 2004/3/4

【첨부서류】

1. 기타첨부서류[수수료 감면 서류{사업자 등록증 사본
및 원천징수이행상황신고서 사본}]_1통

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.11.12
【발명의 명칭】	암세포 표적성 유전자 전달방법
【발명의 영문명칭】	CANCER CELL TARGETING GENE DELIVERY METHOD
【출원인】	
【명칭】	학교법인 인제학원
【출원인코드】	2-1999-052343-1
【출원인】	
【명칭】	(주)백터코어에이
【출원인코드】	1-2000-052386-1
【출원인】	
【명칭】	(주)에이프로젠
【출원인코드】	1-2001-037163-0
【대리인】	
【성명】	이현실
【대리인코드】	9-1999-000366-5
【포괄위임등록번호】	2000-065198-6
【포괄위임등록번호】	2001-054598-2
【포괄위임등록번호】	2001-054600-2
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2003-074481-0
【포괄위임등록번호】	2000-065196-1
【포괄위임등록번호】	2001-054598-2
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김연수
【성명의 영문표기】	KIM, Yeon-Soo
【주민등록번호】	590710-1042218



1020030079897

출력 일자: 2004/3/4

【우편번호】	137-780
【주소】	서울특별시 서초구 서초4동 1687번지 유원아파트 101동 1607호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	소인섭
【성명의 영문표기】	SO, In Seop
【주민등록번호】	670520-1674717
【우편번호】	305-728
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 세종아파트 101동 907호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이영관
【성명의 영문표기】	LEE, Young-Kwan
【주민등록번호】	701203-1496318
【우편번호】	305-729
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 청구나래아파트 110동 1004호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김종필
【성명의 영문표기】	KIM, Jongpil
【주민등록번호】	700128-1117143
【우편번호】	302-748
【주소】	대전광역시 서구 월평3동 하나로아파트 107동 1205호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	강문경
【성명의 영문표기】	KANG, Monnkyung
【주민등록번호】	730118-2350315
【우편번호】	306-762
【주소】	대전광역시 대덕구 목상동 185-1 동원상록수아파트 104동 502호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 홍효정
 【성명의 영문표기】 HONG, Hyejeong
 【주민등록번호】 560612-2011112
 【우편번호】 302-772
 【주소】 대전광역시 서구 둔산1동 크로바아파트 117동 201호
 【국적】 KR

【심사청구】 청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 11
 【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인
 이현실 (인) 대리인
 장성구 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	36 면	36,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	10 항	429,000 원
【합계】	494,000 원	
【감면사유】	학교	
【감면후 수수료】	247,000 원	

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 암세포 표적성 유전자 전달방법에 관한 것으로, 구체적으로 종양 관련 당단백질 (tumor associated glycoprotein) 표면항원에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체 (monoclonal antibody) 유래의 단쇄항체 (Single chain antibody)와 레트로바이러스 외피당단백질 (retrovirus envelope glycoprotein)이 융합된 키메라 리간드 (chimeric ligand), 상기 키메라 리간드를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터, 상기 발현벡터가 형질도입되어 레트로바이러스를 생산하는 포장세포주, 상기 발현벡터 및 포장세포주를 이용하여 얻은 재조합 레트로바이러스 및 상기 키메라 리간드 또는 이를 생산하는 포장세포주를 유효성분으로 하는 유전자 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 키메라 리간드는 Tag-72를 발현하는 종양세포를 대상으로 형질도입 효율이 매우 높고, 표적세포에 특이적으로 감염되어 치료 유전자를 효과적으로 전달할 수 있으므로 암의 성장 및 전이 억제를 위한 유전자 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

【대표도】

도 4



【명세서】

【발명의 명칭】

암세포 표적성 유전자 전달방법{CANCER CELL TARGETING GENE DELIVERY METHOD}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 GalV 외피당단백질 (GalV envelope glycoprotein; GalV Env GP)과 유사한 포유동물 타입-C 레트로바이러스의 외피당단백질 구조를 나타낸 것이고,

a: 시그날 펩티다제 절단부위,	b: SU/TM 절단부위,
c: R-펩타이드 절단부위,	SP: 시그날 펩타이드,
VRA: 가변영역 A,	VRB: 가변영역 B,
VRC: 가변영역 C,	RBD: 수용체 결합 도메인,
PRR: 프롤린 풍부지역,	CT: SU의 C-말단부위,
SU: 표면 서브유닛,	FP: 융합 단백질,
Anc: 고정지역 (anchorage region),	RP: R-펩타이드,
TM: 막관통 도메인,	

도 2는 여러 레트로바이러스 외피당단백질 부위의 아미노산 정렬 (alignment)을 나타낸 것이고,

VRA: 가변영역 A,	VRB: 가변영역 B,
VRC: 가변영역 C,	PRR: 프롤린 풍부지역,
SU: 표면 도메인,	TM: 막관통 도메인

도 3은 레트로바이러스 외피당단백질의 2차 구조를 분석한 것이고,

VRA: 가변영역 A,

VRB: 가변영역 B

SU: 표면 도메인,

TM: 막관통 도메인

도 4는 본 발명의 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 (ScFv-GaLV Env GP) 키메라 리간드 FvGEL199 및 GaLV 외피당단백질을 발현하는 벡터의 구조를 간단히 나타낸 것이고,

도 5는 본 발명의 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 (ScFv-GaLV Env GP) 키메라 리간드 FvGEL199를 포함하는 포장세포주에서 키메라 리간드 FvGEL199의 발현을 웨스턴 블롯 분석으로 확인한 결과이고,

A: HCMV 프로모터에 의해 전사가 조절되는 벡터에서 발현된 FvGEL199

레인 1: pHEGEL을 포함하는 GP293 세포 추출액,

레인 2: pHEFvGEL199를 포함하는 GP293 세포 추출액,

B: MCMV 프로모터에 의해 전사가 조절되는 벡터에서 발현된 FvGEL199

레인 1: pMEGEL을 포함하는 GP293 세포 추출액,

레인 2: pMEFvGEL199를 포함하는 GP293 세포 추출액

도 6은 본 발명의 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 (ScFv-GaLV Env GP) 키메라 리간드 FvGEL199를 포함하는 레트로바이러스에서 키메라 리간드 FvGEL199의 발현을 웨스턴 블롯 분석으로 확인한 것이고,

레인 1: pHEGEL을 포함하는 GP293 세포 배양액으로부터 얻은 바이러스 침전물,

레인 2: pHEFvGEL199를 포함하는 GP293 세포 배양액으로부터 얻은 바이러스 침전물

도 7a 및 도 7b는 다양한 인간 암 세포주에서 Tag-72 발현 세포주를 각각 FACS 분석 및 면역조직화학 염색방법으로 확인한 결과이고,

도 8은 본 발명의 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 (ScFv-GaLV Env GP) 키메라 리간드 FvGEL199 발현 재조합 벡터에 의한 표적세포의 감염을 나타낸 것이고,

도 9는 본 발명에서 구축한 GP293HEFvGEL199 및 GP293HEGEL 포장세포주에 LacZ 발현 레트로바이러스 벡터를 형질도입한 후 획득한 바이러스로 각 표적세포를 감염시킨 결과이고,

도 10은 본 발명에서 구축한 GP293HEFvGEL199/lacZ 및 GP293HEGEL/lacZ 바이러스 생산세포주를 배양하여 획득한 바이러스로 각 표적세포를 감염시킨 결과이고,

도 11a는 Tag-72 양성 및 음성 세포주에서 암 세포주 정맥주사에 의한 전이덩어리의 생성을 해부현미경 ($\times 10$)으로 관찰한 사진이고,

도 11b는 도 11a에서 현미경상으로 관찰된 전이덩어리의 수를 나타낸 그래프이고,

도 12a는 생체내에서의 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 (ScFv-GaLV Env GP) 키메라 리간드 FvGEL199 발현 레트로바이러스에 의한 LacZ 유전자의 형질도입을 나타낸 해부현미경 사진이고,

도 12b는 도 12a에서의 LacZ 유전자의 생체 내 형질도입 효율을 상대적으로 나타낸 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- 36> 본 발명은 종양 관련 당단백질 표면항원에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체 유래의 단쇄항체와 레트로바이러스 외피당단백질이 융합된 키메라 리간드, 상기 키메라 리간드를 암호화하는 유전자를 포함하는 발현벡터, 상기 발현벡터가 형질도입된 재조합 레트로바이러스 및 상기 키메라 리간드를 유효성분으로 하는 유전자 치료용 조성물에 관한 것이다.
- 37> 유전자 치료는 선천성 대사 이상으로 인해 발병하는 여러 질병들 외에 암, 당뇨병, 에이즈 등을 비롯한 후천적인 많은 질병들을 다루는데 있어서 획기적인 치료방법으로 주목받고 있다. 이 중 레트로바이러스를 이용한 유전자 전달 시스템은 아데노바이러스나 리포좀 등을 이용한 시스템에 비해 유전자 치료에 적용하기에 유리한 다양한 장점을 갖는다. 그러나, 세포 특이적인 유전자 전달 시스템의 개발이 레트로바이러스를 이용하는 방법을 비롯한 다른 유전자 치료에 걸림돌로 작용하고 있어 이를 해결하는 것이 유전자 치료의 성패를 좌우하는 열쇠라 할 수 있다. 최근에 이러한 문제점들을 해결하기 위한 노력으로 몇 가지 방법들이 시도되고 있다.
- 38> 레트로바이러스를 이용하여 치료 유전자를 표적세포에 특이적으로 도입하는 방법으로, 당분자를 화학적인 방법에 의해 레트로바이러스의 외피당단백질에 붙여서 표적세포의 아시알로당단백질 수용체 (asialoglycoprotein receptor)에 결합하게 하는 방법 (Neda, H. et al., *J. Biol. Chem.* 266: 14143-14146, 1991), 레트로바이러스의 외피당단백질과 표적세포의 수용체

혹은 표면항원에 양쪽으로 결합할 수 있는 연결 항체를 이용한 방법 (Goud B. et al., 163: 251-254, 1988; Roux, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 9079-9083, 1989; Etienne-Julan, M. et al., *J. Gen. Virol.* 73: 3251-3255, 1992), 단쇄항체를 레트로바이러스의 외피당단백질에 유전공학적인 방법으로 결합시켜 표적세포를 감염시키는 방법 (Russell, S. J. et al., *Nucleic Acids Res.* 21: 1081-1085, 1993; Somia, N. V. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 7570-7574, 1995; Ager, S. et al., *Hum. Gene Ther.* 7: 2157-2164, 1996; Marin, M. et al., *J. Virol.* 70: 2957-2962, 1996; Schnierle, B. S. et al., *Gene Ther.* 3: 334-342, 1996), 펩타이드 리간드 (peptide ligand)를 레트로바이러스의 외피당단백질에 유전공학적인 방법으로 결합시켜 표적세포를 감염시키는 방법 (Kasahara, N. et al., *Science* 266: 1373-1376, 1994; Cosset, F. L. et al., *J. Virol.* 69: 6314-6322, 1995; Schnierle, B. S., and Groner, B., *Gene Ther.* 3: 1069-1073, 1996) 등이 보고되어 있다. 그러나, 지금까지 보고된 상기 방법들 대부분이 매우 낮은 형질도입 (transduction) 효율을 나타내는 것으로 알려져 있다.

- 39> 치료 유전자를 사람의 표적세포에 도입하기 위하여 조류 레트로바이러스를 이용하거나 (Chu, T-H. T., and R. Dornburg. *J. Virol.* 69: 2659-2663, 1995; Chu, T-H. T. et al., *Gene Ther.* 1: 292-299, 1994; Valsesia-Wittmann, S. et al., *J. Virol.* 68: 4609-4619, 1994) 무린 레트로바이러스를 이용한 경우 (Cosset, F-L. et al., *J. Virol.* 69: 6314-6322, 1995; Han, X. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 9747-9751, 1995; Kasahara, N. et al., *Science* 266: 1373-1376, 1994; Somia, N.V. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7570-7574, 1995; HAN, J.Y., et al., *J. Virol.* 71, 8103-8108, 1997)가 보고되었다. 무린

레트로바이러스는 이들의 구조 및 기능에 대한 연구가 많이 되어있고, 특히 Mo-MuLV와 Fr-MuLV 외피당단백질의 X-ray 결정 3차 구조가 최근에 밝혀진 바 있다.

<40> 표적세포의 수용체 (receptor) 또는 표면항원이 알려져 있지 않거나 특이적이지 않은 경우에는 힘들지만, 단쇄항체 (single-chain antibody: ScFv)를 레트로바이러스의 외피당단백질에 유전공학적인 방법으로 결합시켜 표적세포를 감염시키는 방법이 표적세포의 특이적인 감염에 유용하게 사용되고 있다.

<41> 단쇄항체 (ScFv)란 중쇄 (H)와 경쇄 (L)의 가변영역인 V_L 과 V_H 로 이루어진 Fv (fragment variable)가 적절한 아미노산 링커에 의해 V_H 의 카복시 말단 (carboxy-terminal)과 V_L 의 아미노 말단 (amino-terminal)이 연결되어 단쇄 (single chain) 형태로 발현되는 항체이다 (Poon et al., *Molecular Immunology* 39: 19-24, 2002; Fujiwara et al., *Biochemistry* 41: 12729-12738, 2002).

<42> 최근에는 안전성과 효율 등이 향상된 가성타입 (pseudotype) 레트로바이러스 벡터 시스템이 연구되고 있는데, 여러 인체 세포주에서 양향성 (amphotropic) 뮤린 레트로바이러스 벡터보다 원숭이 백혈병 바이러스 (Gibbon Ape Leukemia Virus, GaLV) Env-가성타입 레트로바이러스 벡터가 5 내지 30배정도 감염효율을 증가시킨 것이 보고 되었다 (Kim et al., *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 38: 177, 1997).

<43> 이에, 본 발명자들은 레트로바이러스를 이용한 효율적인 유전자 전달 시스템을 개발하고자 연구 노력한 결과, GaLV 외피당단백질에 종양 관련 당단백질 (tumor associated glycoprotein)인 Tag-72 표면항원에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체 (monoclonal antibody) 유래의 단쇄항체 (Single chain antibody)를 융합시킨 키메라 리간드 (chimeric ligand)를 제작하였고, 상기 키메라 리간드를 포함하는 재조합 레트로바이러스가 높은 형질도

입 효율로 표적세포에 특이적으로 감염되어 치료 유전자를 효과적으로 전달할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- 4> 본 발명의 목적은 형질도입 효율이 매우 높고, 표적세포 특이적으로 감염되어 치료 유전자를 효과적으로 전달할 수 있는 암세포 표적성 레트로바이러스 유전자 전달 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- 5> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 종양 관련 당단백질 Tag-72 표면항원에 특이적으로 결합하는 단쇄항체 (single chain antibody, ScFv)와 레트로바이러스 외피당단백질 (retrovirus envelope glycoprotein)이 융합된 키메라 리간드를 제공한다.
- 16> 또한, 본 발명은 상기 키메라 리간드를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터 및 상기 발현벡터가 형질도입되어 레트로바이러스를 생산하는 포장세포주를 제공한다.
- 17> 아울러, 본 발명은 상기 키메라 리간드 또는 이를 생산하는 포장세포주를 유효성분으로 하는 암세포 표적성 유전자 치료용 조성물을 제공한다.
- 48> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- 49> 본 발명은 종양 관련 당단백질 Tag-72 표면항원에 특이적인 단쇄항체와 GaLV 외피당단백질이 융합된 키메라 리간드를 제공한다.

- 50> 본 발명에서는 결장암, 위암, 유방암, 난소암, 전립선암 등을 포함한 여러 암세포에서 발현되는 종양 관련 당단백질인 Tag-72 표면항원에 특이적으로 결합하는 단쇄항체를 레트로바이러스 유전자 전달 시스템에 적용하였다. 또한, 본 발명은 치료 유전자를 인간의 표적세포에 효율적으로 도입하기 위하여 MuLV (Murine Leukemia Virus) 외피당단백질보다 높은 인체 암세포로의 형질도입 효율과 인체 혈액에 대한 안정성을 보이는 GaLV 외피당단백질을 이용하였다.
- 51> 레트로바이러스가 세포를 감염시키기 위해서는, 먼저 바이러스 표면의 외피당단백질과 세포 수용체 (receptor)간의 결합이 이루어져야 한다. 이때, 바이러스 표면의 특정 외피당단백질과 숙주세포의 특정 수용체간의 특이적인 결합이 바로 감염의 특이성을 결정짓는 요인이 된다. 이 후 바이러스가 세포 내로 도입되는 방법과 경로는 레트로바이러스의 종류에 따라 다양한 특징을 보인다. 표적세포 특이적인 유전자 전달 시스템에서는 세포 특이성을 갖게 하는 바이러스의 외피당단백질을 원하는 표적세포의 수용체에 결합하도록 조작하면 표적세포만을 특이적으로 감염시키는 바이러스를 제조할 수 있다. 이에, 본 발명에서는 GaLV 외피당단백질에서 세포 특이성을 결정하고 세포의 수용체와 결합하는 표면 서브유닛 (surface subunit, SU) 부위에 다양한 암 세포에서 발현되는 Tag-72에 특이적으로 결합하는 단쇄항체 Tag-72pS1을 붙인 융합 키메라 리간드를 제조하였다. 상기 단쇄항체가 융합된 외피당단백질을 발현하는 레트로바이러스는 표적 암세포에 특이적으로 결합하여 치료 유전자를 전달하게 된다.
- 52> GaLV와 유사한 구조를 가진 MuLV의 경우, 외피당단백질에 도입된 점 돌연변이 (point mutation), 삽입 돌연변이 (insertion mutation) 혹은 삭제 돌연변이 (deletion mutation)는 구조에 변화를 일으켜 잘못된 기능을 가진 바이러스 외피당단백질을 생산함으로써 바이러스의 감염성을 저하시키게 된다는 연구 결과들이 보고된 바 있다 (Russell, S. J. et al., *Nucleic Acids Res.* 21: 1081-1085, 1993; Somia, N. V. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:

7570-7574, 1995; Ager, S. et al., *Hum. Gene Ther.* 7: 2157-2164, 1996; Marin, M. et al., *J. Virol.* 70: 2957-2962, 1996; Schnierle, B. S. et al., *Gene Ther.* 3: 334-342, 1996; Chris A. Benedict. et al., *Human Gene Therapy* 10: 545-557, 1999; Mariana Marin. et al., *Journal of Virology* 70: 2957-2962, 1996; Te-Hua Tearina C. H. and Ralph Dornburg, 71: 720-725, 1997). 즉, 외부의 펩타이드가 외피당단백질에 삽입되거나 혹은 외피당단백질의 일정 부분을 삭제하고 삽입될 때 대부분의 경우에 감염성이 현저히 저하된 바이러스를 생산하게 된다. 따라서, 레트로바이러스의 외피당단백질에 ScFv와 같은 외부 리간드를 삽입하고자 할 경우에는 외피당단백질의 구조-기능 관계를 세심하게 고려하여야 한다. 본 발명에서는 외피당단백질의 SU 부위 중 세포 특이성과 세포 표면에 대한 결합에 관련된 부위 중 가변영역 B (variable region B: VRB)에 단쇄항체 (single-chain antibody: ScFv)를 삽입하여 표적세포에 특이적으로 감염되도록 설계된 키메릭 리간드를 제조하였다.

- 53> 본 발명의 바람직한 실시예에서는, GaLV 외피당단백질의 가변영역 B 부위, 즉 시그널 펩타이드의 번역개시 코돈인 메티오닌으로부터 199번째와 200번째 아미노산 사이에 Tag-72에 특이적으로 결합하는 단쇄항체 Tag-72pS1이 삽입된 키메릭 리간드 및 세포내에서 이를 발현하는 발현백터를 제조한다. 본 발명에 사용된 GaLV 외피당단백질 유전자는 R-펩타이드를 지닌 SEATO 타입 (NCBI Accession No. AAC96083)으로 서열번호 7로 기재되는 염기서열을 가지며, Tag-72 특이적인 단쇄항체 Tag-72pS1 유전자는 서열번호 8로 기재되는 염기서열을 갖는다. FvGEL199로 명명된 상기 키메릭 리간드는 서열번호 10으로 기재되는 염기서열을 가지며, 이로부터 서열번호 11로 기재되는 폴리펩타이드를 코딩하는데, 단쇄항체 Tag-72pS1이 Gly₄Ser로 이루어진 5개의 아미노산 링커에 의해 GaLV의 외피당단백질에 연결된다.

- 4> 이와 같이 제조된 단쇄항체 GaLV 외피당단백질 (ScFv-GaLV Env GP) 키메라 리간드를 HCMV 프로모터 또는 MCMV 프로모터에 의해 전사가 조절되며 EF1a 인트론에 의하여 전사 활성이 촉진되도록 설계된 골격백터 pHYKEF1 및 pMYKEF1 (Kim et al., *J. Biotechnol*, 93: 183, 2002)에 삽입하여 발현백터 pHEFvGEL199 및 pMEFvGEL199를 제조하였다. 상기 발현백터들은 단쇄항체 Tag-72pS1이 GaLV 외피 당단백질 SU 부분의 199번 및 200번째 아미노산 사이에 삽입되어 956개 아미노산으로 구성된 융합 폴리펩타이드를 발현한다.
- 15> 본 발명은 또한 상기 키메라 리간드를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 레트로바이러스 벡터가 형질도입되어 레트로바이러스를 생산하는 포장세포주를 제공한다.
- 16> 본 발명에 사용될 수 있는 포장세포주로는 동물 세포주로의 감염을 매개할 수 있는 바이러스 외피당단백질을 포함하지 않고 Gag-Pol 단백질을 발현하는 세포주로서 그 일례로 GP293 (Clontech)을 들 수 있다. 형질도입 방법으로는 칼슘 포스페이트 공침전 방법 (calcium phosphate coprecipitation; Sambrook et al., *Molecular Cloning*, 2nd ed., 1989), 리포펙타민 방법 (Invitrogen사, 미국) 등의 당 분야에서 잘 알려진 방법들을 사용할 수 있다. 형질도입된 세포주는 적절한 선별 배지, 예를 들어 항생제 G418을 포함하는 배지에서 배양하여 콜로니로서 선별할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 재조합 레트로바이러스 벡터 pHEFvGEL199를 Gag-Pol 단백질을 생산할 수 있는 포장세포주 GP293에 형질도입하여 가장 높은 역가 (titer)로 재조합 레트로바이러스를 생산할 수 있는 포장세포주 GP293HFvGEL199를 분리하였다.
- 57> 본 발명의 상기 포장세포주 및 약제학적으로 허용되는 담체는 인체 암세포에 표적세포 특이적으로 효율적으로 형질도입되고 고효율로 발현되어 암의 성장 및 전이를 효과적으로 억제시킬 수 있다.

- 8> 따라서, 본 발명에서는 유효량의 포장세포주 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- 9> 본 발명의 약학 조성물은 주사 투여 형태로 제형화 할 수 있다. 주사용 제형으로는 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다. 상기 조성물은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있으며 활성성분인 포장세포주를 약 10^5 내지 10^8 세포수/kg, 바람직하게는 약 10^6 내지 10^7 세포수/kg 체중의 범위일 수 있고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 활성 성분의 실제 투여량은 치료 조건, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 암의 종류 및 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.
- 10> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- 11> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- 12> <실시예 1> 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드 발현 레트로바이러스의 제조
- 13> <1-1> GaLV 외피당단백질의 구조 및 기능분석
- 14> GaLV 외피당단백질 (envelope glycoprotein, Env GP)에 Tag-72에 대해 특이적인 단쇄항체 Tag-72pS1이 융합된 키메라 리간드를 제조하기 위해서는 먼저 단쇄항체가 GaLV 외피당단백

질에 삽입될 적절한 위치를 선별하는 것이 중요하다. 이를 위하여 GaLV 외피당단백질의 구조 및 기능분석이 요구되는데, MuLV 또는 HIV와 같은 다른 레트로바이러스의 외피당단백질이나 인플루엔자 A 바이러스 (influenza A virus)의 혈구응집소 (haemagglutinin, HA)와는 달리, GaLV 외피당단백질의 3차 구조 및 기능에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 이에, 본 발명에서는 GaLV 외피당단백질과 유사성이 있는 다른 레트로바이러스의 외피당단백질을 대상으로 하여 이들 외피당단백질간의 서열 유사성 (homology search)을 Pfam (Protein Families Database of Alignments and HMMs) 분석을 통해 조사하였고, 이들 바이러스의 외피당단백질 중 몇 가지는 GaLV 외피당단백질의 특징에서 나타나는 SU의 구조가 가변영역 A (VRA), 가변영역 B (VRB), 가변영역 C (VRC), 프롤린 풍부지역 (PRR)으로 구성되어 있으며, 막관통 (transmembrane, TM) 부위의 카르복실기 말단 (C-말단)에 R-펩타이드가 존재하는 구조를 가지고 있음을 확인하였다. 이러한 포유동물 타입 C 레트로 바이러스 Fr-MuLV, 감마 레트로바이러스 GaLV, FLV 및 MuLV의 외피당단백질과의 유사성 (상동성 조사)을 여러 가지 컴퓨터프로그램을 통해 분석한 결과, 특이적 수용체 결합부위로 알려진 RBD (receptor binding domain), 기능이 알려져 있지 않은 프롤린 풍부지역 (PRR), C-말단부위 이외의 부위에서 매우 높은 아미노산 서열의 유사성 (homology)과 동일성 (identity)이 나타남을 확인하였다 (표 1 및 도 1).

【표 1】

외피당단백질	NCBI 등재 번호	바이러스	캡트르바이러스 스 타입	유사성 (%)	상동성 (%)
Env_GaLV/1-685	AAC96083	긴팔원숭이 류케미아 바이러스 (SEATO)	감마	100	100
Env_GaLV/1-667	AAA46811	긴팔원숭이 (Gibbon ape) 류케미아 바이러스	감마	97	97
Env_FLVC6/1-668	AAA30809	프렌드 류케미아 프로바이러스 (클론 CFE-6)	감마	61	39
Env_FLVGL/1-642	AAA43053	펠린 류케미아 바이러스 (세포주 A/Glasgow-1)	감마	63	41
Env_MLVF5/1-675	CAA26561	프렌드 류린 류케미아 바이러스 (분 리주 57) (Fr-MuLV)	포유동물 C	66	46
Env_MLVCB/1-661	AAA46512	Cas-Br-E 류린 류케미아 바이러스	감마	65	45
Env_MLVHO/1-666	M26527	HoMuLV 류린 류케미아 바이러스 (Mus 호르틀라누스 바이러스)	감마	64	43
Env_MLVAV/1-669	AAB03092	AKV 류린 류케미아 바이러스	감마	64	45

- 6> 이러한 유사성 분석결과를 토대로, 구조-기능 및 X-ray 결정 3차 구조가 알려져 있는 Fr-MuLV 외피당단백질 (NCBI PDB 등재번호: 1AOL)과의 비교 분석 및 GaLV의 외피당단백질의 2차 구조 분석을 통해 Tag-72에 특이적인 단쇄항체가 GaLV 외피당단백질에 삽입될 적절한 위치를 조사하였다. 먼저, 아미노산 서열에서 보존된 부위는 진화적으로 불 때 구조 및 기능상 중

요한 부위일 경우가 많으므로 삽입위치의 첫 번째 고려 대상은 변이, 자연선택, 적응, 진화의 과정에 유연성을 지닌 다변화지역이다. 이에 따라 여러 가지 GaLV 외피당단백질의 아형과 다양한 포유동물 타입-C 레트로바이러스 외피당단백질의 아미노산 정렬 (alignment)을 통하여 GaLV 외피당단백질의 다변화지역을 결정하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 두 번째 고려 대상은 외피당단백질의 구조-기능의 변화를 최소화할 수 있는 위치를 결정하는 것으로, 친수성 (hydropathy), 표면가능성 (surface probability), 항원 지수 (antigenic index), α -헬릭스, β -시트, 코일 구조, 반환 플롯 (turn plot) 또는 빈도, 유연성 (flexibility)과 같은 GaLV Env 당단백질의 2차 구조 분석을 통하여 이들 지역의 적절한 삽입위치를 선택하였다. 또한, 이들 부위들을 3차 구조가 밝혀진 Fr-MuLV 외피당단백질과 비교함으로써 3차 구조상의 적절한 삽입위치를 예측하였다. 이로부터, GaLV 외피당단백질의 특이적 수용체 인지 및 결합에 관련된 부위 (receptor binding domain; RBD)이며 다변화지역인 가변영역 B (VRB) 부위를 Tag-72에 대한 단쇄항체가 삽입될 위치로 선택하였다.

> 도 3은 레트로바이러스 외피당단백질의 2차 구조를 분석한 것으로, 단쇄항체가 GaLV 외피당단백질에 삽입될 위치는 가변영역 B 내 199번째 및 200번째 아미노산 사이로 붉은 색 실선으로 표시되어 있으며, 아미노산 서열상의 위치는 숫자로 표시되어 있고, 여기에 표시된 아미노산 서열은 시그날 펩타이드가 포함된 것으로 메티오닌이 1번 아미노산이다.

> <1-2> 단쇄항체와 레트로바이러스 외피당단백질이 융합된 키메라 리간드의 제조

> GaLV 외피당단백질과 Tag-72에 특이적으로 결합하는 단쇄항체 Tag-72pS1이 융합된 키메라 리간드를 제조하기 위하여, 대한민국 특허 제318761호에서 제조한 AKA 인간화항체의 중쇄 및 경쇄 가변영역으로부터 휴스턴 등 (Huston et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879-5883, 1988)의 방법으로 단쇄항체를 제작한 후 이를 pCANTAB5E의 제한효소 SfiI/NotI 부위에 서브클로닝하여 pCANTAB-3E8ScFvPreS1 벡터를 제작하였고, 야생형 GaLV (SEATO) 외피당단백질 유전자 (NCBI Accession No. AAC96083)를 골격벡터 pHYKEF-1 (Kim et al., *J. Biotechnol.*, 93: 183, 2002)에 클로닝하여 pHEGEL 벡터를 제작하였다. 상기에서 제작된 pCANTAB-3E8ScFvPreS1 및 pHEGEL 벡터를 각각 주형으로 하여 DNA 중합효소 연쇄반응 (PCR)을 수행함으로써 키메릭 리간드를 제조하였다.

- ▷ 이때, 주형으로 사용한 GaLV Env 당단백질 유전자는 R-펩타이드를 지닌 SEATO 타입 (NCBI Accession No. AAC96083)으로 서열번호 7로 기재되는 염기서열을 가지며, Tag-72 특이적 단쇄항체 Tag-72pS1의 유전자는 서열번호 8로 기재되는 염기서열을 갖는다. Tag-72에 대한 단쇄항체 Tag-72pS1은 중쇄 (H)와 경쇄 (L)의 가변영역인 V_L 과 V_H 로 이루어진 Fv (fragment variable)가 $(Gly_4Ser)_3$ 로 이루어진 15개의 아미노산 링커에 의해 V_H 의 카복시 말단 (carboxy-terminal)과 V_L 의 아미노 말단 (amino-terminal)이 연결되어 단쇄 (single chain) 형태로 발현되는 단쇄항체이다. 단쇄항체의 C-말단부위에는 서열번호 9로 기재되는 PreS1 에피토프 (GANANPDWDFNP)가 표지되어 있다. 이때, 단쇄항체 Tag-72pS1이 GaLV 외피당단백질의 가변영역 B 부위, 즉 시그날 펩타이드의 번역개시 코돈이 메티오닌으로부터 199번과 200번째 아미노산 사이에 삽입된 키메릭 리간드를 제조하기 위하여 다음과 같이 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 이하 본 발명에 사용된 PCR 방법을 자세히 설명한다.

- 1> pHEGEL 벡터를 주형으로

서열번호 1의 Env F 시발체와 서열번호 2의 597LN 시발체를 이용하여 680 bp의 PCR 산물을 얻었다. pHEGEL 벡터를 주형으로 서열번호 3의 LC597 시발체와 서열번호 4의 Spike R2 시발체를 이용하여 1,500 bp의 PCR 산물을 얻었다. pCANTAB-3E8ScFvPreS1 벡터를 주형으로 서열번호 5의 LnkNScFv 시발체와 서열번호 6의 ScFvLnkC 시발체를 이용하여 820 bp의 PCR 산물을 얻었다. 각각의 PCR 산물을 모두 혼합한 후 이를 주형으로 서열번호 1의 Env F 시발체와 서열번호 4의 Spike R2 시발체를 이용하여 2,930 bp의 PCR 산물을 얻었다. 각 PCR 조건은 100 μ l 반응용액당, 주형 DNA 200 ng, 각 시발체 50 pmol씩, dNTP 0.2 mM 그리고 중합효소 5 단위를 사용하였다. PCR 완충용액은 20 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0.1% 트리톤 X-100 및 0.1 mg/ml 아세틸화 BSA (pH 8.8)로 구성되며, PCR 반응에 사용한 효소는 Pfu DNA 중합효소 (Bioneer사, 대한민국) 또는 Takara Ex Taq (TaKaRa사, 일본)을 사용하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 4분간 전-변성시킨 후, 94°C에서 1분간의 변성반응, 55°C에서 1분간의 어닐링반응 및 72°C에서 3분간의 연장반응을 30회 반복한 후 72°C에서 10분간 최종 연장시켰다.

72> 상기 방법으로 증폭된 2,930 bp의 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드 유전자 절편을 제한효소 BamHI과 XbaI으로 절단하고, HCMV 프로모터 또는 MCMV 프로모터에 의해 전사가 조절되며 EF1a 인트론에 의하여 전사 활성이 촉진되도록 설계된 고효율유전자 발현 골격벡터 pHYKEF1 또는 pMYKEF1 (Kim et al., *J. Biotechnol*, 93: 183, 2002)의 동일한 제한효소 BamHI과 XbaI 인식부위에 삽입하여 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드 유전자 발현 재조합 벡터 pHEFvGEL199 및 pMEFvGEL199를 제조하였다. 대조군으로 야생형 GaLV (SEATO) 외피당단백질 유전자를 상기 골격벡터에 삽입하여 발현벡터 pHEGEL 및 pMEGEL을 제조하였다. 염기서열

분석을 통해, 발현벡터 pHEFvGEL199 및 pMEFvGEL199에 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드 유전자 절편이 삽입되었음을 확인하였고, 상기 키메라 리간드를 FvGEL199로 명명하였다.

상기에서 제조된 GaLV 외피당단백질과 Tag-72에 특이적으로 결합하는 단쇄항체 Tag-72pS1이 융합된 키메라 리간드 FvGEL199는 서열번호 10으로 기재되는 염기서열을 가지며, 이로부터 서열번호 11로 기재되는 펩타이드를 코딩한다. 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 융합 키메라 리간드 FvGEL199의 모식도를 도 4에 나타내었다. 재조합 레트로바이러스 벡터 pHEGEL 및 pMEGEL은 685개 아미노산으로 구성된 야생형 GaLV 외피당단백질을 발현하는 벡터이고, 발현벡터 pHEFvGEL199/pMEFvGEL199는 단쇄항체 Tag-72pS1이 GaLV 외피당단백질 SU 부분의 199번 및 200번째 아미노산 사이에 삽입되어 956개 아미노산으로 구성된 융합 폴리펩타이드를 발현하는 벡터이다. 단쇄항체 Tag-72pS1이 GaLV 외피당단백질에 삽입된 융합 키메라 리간드 FvGEL199는 Tag-72pS1이 Gly₄Ser로 이루어진 5개의 아미노산 링커에 의해 GaLV의 외피당단백질에 연결되어 있다.

↳ <1-3> 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 (ScFv-GaLV Env GP) 키메라 리간드의 발현

5> 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드를 발현하는 레트로바이러스를 생산하기 위해서는 먼저 세포 내에서 키메라 리간드가 발현된 후, 소포체 (endoplasmic reticulum, ER)와 골지체에서 전사 후 변형 (posttranslational modification)과 삼중화 (trimerization) 및 SU/TM 부위의 절단이 일어난 뒤 세포 표면으로 이동하여 바이러스의 외피막에 안정적으로 분포되어야 한다. 이후 바이러스 패키징 시, 외피막에 분포된 키메라 리간드가 표적세포의 특정 수용체를 인지, 결합하여 세포 내로 들어간 뒤 막간 융합을 통해 바이러스 입자가 세포질로 유입되어

비로소 바이러스 감염이 이루어지는 것이다. 상기 실시예 <1-2>에서 제조된 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드를 발현하는 재조합 레트로바이러스 벡터 pHEFvGEL199 및 pMEFvGEL199가 세포 내에서 키메라 리간드를 발현하는지 확인하였다.

- > 구체적으로, Tag-72에 특이적인 단쇄항체 Tag-72pS1과 GaLV 외피당단백질이 융합된 키메라 리간드를 발현하는 재조합 발현벡터 pHEFvGEL199 및 pMEFvGEL199를 리포펙타민 플러스 (Invitrogen사, 미국)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 사람 신장 상피세포 (human kidney epithelial cells)인 293 혹은 293T 세포에 도입하였다. 6웰 플레이트에 2×10^5 개의 293 세포를 형질도입 하루 전에 분주하고, 상기 재조합 레트로바이러스 벡터 pHEFvGEL199 및 pMEFvGEL199로 형질도입시켰다. 이때, 키메라 리간드를 발현하지 않는 대조군으로는 pHEGEL 및 pMEGEL 벡터를 형질도입하여 사용하였다. 형질도입 세포를 10% 소 태아 혈청 (FBS, HyClone), 100 U/ml의 페니실린 G, 0.1 mg/ml 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL) 배지에서 5% CO₂를 공급하면서 37°C에서 3 내지 6시간 동안 배양한 후 배지를 갈아주고 2일간 더 배양하여 배양액 및 세포를 회수하였다. 배양된 세포를 각각 100 μ l의 인산염 완충용액 (PBS)에 현탁하고 동량의 SDS-PAGE 시료 완충용액 (4% SDS, 20% 글리세롤, 10% β -메르캅토에탄올, 0.05% 브로모 페놀 블루, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8)을 처리한 후 전기영동을 수행하고 웨스턴 블롯 분석으로 융합 키메라 리간드의 발현을 확인하였다.

- > SDS-PAGE는 램리 (Laemmli, U. K.,

Nature 277: 680-685, 1970)의 방법에 따라 수행하였으며, 전기영동한 단백질은 전달 완충용액 (Transfer buffer, 10 mM 글리시, 20% 메탄올, 0.1% SDS, 100 mM Tris-HCl)을 사용하여 80 V 에서 3시간 동안 전류를 흘려 PVDF 막으로 옮겨 붙였다. 웨스턴 블롯 분석은 토우빈 (Towbin, H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354, 1979)의 방법에 따라 수행하였으며, 블롯을 TBST 완충용액 (150 mM NaCl, 0.1% 트윈20, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4)으로 5분간 세척한 후 5% (w/v) 탈지우유 분말 (non-fat milk powder)이 첨가된 TBST 완충용액 (TTM-5%)에 담가 4 ℃에서 하룻밤 차단 (blocking)하였다. 단쇄항체와 GaLV 외피당단백질이 융합된 키메라 리간드 FvGEL199의 발현을 확인하기 위한 일차항체로 ScFv의 C-말단부위에 표지된 서열번호 9의 PreS1에 대한 마우스 단일클론 항체 (mouse monoclonal antibody raised against PreS1 epitope; Aprogen)를 사용하였다. TTM-5% 완충용액에 1:1,000 내지 1:4,000으로 일차항체를 희석하였고, 이를 PVDF 막과 상온에서 3시간 동안 반응시켰다. TTM-0.5% 완충용액을 이용하여 10분 간격으로 세 번 세척한 후 동일한 완충용액에 1:1,000 내지 1:2,000으로 HRP-접합 염소 항체 항 마우스 IgG (HRP-conjugated goat antibody anti mouse IgG)를 희석한 이차항체를 상 기 막과 상온에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 막을 다시 TTM-0.5% 완충용액으로 10 분 간격으로 다섯 번 세척한 후 TBS 완충용액 (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4)으로 5분 간 행구고 화학발광 시스템 (chemiluminescence system, SantaCruz)과 코닥 바이오맥스 MR 필름 (Kodak Biomax MR film)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 면역블롯 분석 (immunoblot analysis)을 수행하였다. 단백질의 분자량은 전염색 단백질 마커 (prestained protein marker, Bio-Rad)를 전기영동시 사용하여 측정하였다.

78 그 결과, ScFv가 GaLV 외피당단백질에 삽입된 융합 키메라 리간드 FvGEL199는 시그날 펩타이드와 TM 부위가 절단된 718개 아미노산으로 이루어진 펩타이드의 분자량에 해당하는 위

치에서 면역반응이 나타나고 (도 5의 레인 2), 대조군인 GaLV 외피당단백질을 발현하는 pHEGEL 및 pMEGEL에서는 밴드가 나타나지 않는 것을 확인하였다 (도 5의 레인 1). 이로부터 본 발명의 재조합 발현벡터 pHEFvGEL199 및 pMEFvGEL199를 도입한 세포에서 ScFv-GaLV 외피당단백질에 삽입된 융합 키메라 리간드를 발현하고 있음을 확인할 수 있었다.

9> <실시예 2> 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 (ScFv-GaLV Env GP) 키메라 리간드 발현 레트로바이러스의 형질도입

30> <2-1> ScFv-GaLV Env GP 키메라 리간드 발현 레트로바이러스의 제조

31> 바이러스 생산을 위해서 몰로니 뮤린 류케미아 바이러스 (Moloney murine leukemia virus; Mo-MuLV)의 Gag-Pol 단백질을 발현하는 GP293 세포 (Clontech사, 미국)를 사용하였다. 상기 GP293 세포를 10% 소 태아 혈청 (FBS, HyClone), 100 U/ml의 페니실린 G, 0.1 mg/ml 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM 배지에서 5% CO₂를 공급하면서 37℃에서 배양하였다. 융합 키메라 리간드를 발현하는 재조합 발현벡터 pHEFvGEL199와 패키징 시그널 (packaging signal)을 포함하고 LTR 프로모터에 의해 β -갈락토시다제 (β -galactosidase) 유전자를 발현하는 재조합 레트로바이러스 벡터 (recombinant retroviral vector) pMFG/LacZ/puro (Oh et al., *Mol. Cells* 11: 192-197, 2001)를 리포펙타민 방법 (Invitrogen 사, 미국)에 따라 상기 GP293 세포에 형질도입시켰다. 4시간 후 2% FBS가 첨가된 DMEM 배지로 갈아주고 37℃에서 2일간 더 배양하여 세포 및 바이러스가 생산된 배양액을 얻었다. 상기 배양액을 0.45 μ m 필터를 통과시켜 세포 찌꺼기를 제거하여 무세포 바이러스 배양액을 얻었다. 바이러스의 생산을 확인하기 위하여 무세포 바이러스 배양액을 12시간 동안 8,000 rpm, 4℃의 조건으로 원심분리 (Beckman sw55

rotor)하여 상등액을 제거하고 나머지 바이러스 침전물을 분리하였다. 바이러스 침전물을 SDS-PAGE 시료 완충용액에 현탁하여 전기영동을 수행한 뒤 웨스턴 블롯 분석으로 상기 키메라 리간드의 발현을 확인하였다 (도 6). SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석은 상기 실시예 <1-3>과 동일한 방법에 따라 수행하였다. 이때, 일차항체는 마우스 단일클론 Ab 항 PreS1을 사용하였고, 이차항체는 염소 IgG 항 마우스 IgG를 사용하였다.

> 그 결과, 본 발명의 융합 키메라 리간드 FvGEL199는 시그널 펩타이드와 TM 부위가 절단된 718개 아미노산으로 이루어진 펩타이드의 분자량에 해당하는 위치에서 면역반응이 나타난 밴드를 확인할 수 있었다 (도 6의 레인 2). 이로부터, 상기에서 제조된 재조합 레트로바이러스의 외피막에 본 발명의 ScFv-GaLV Env GP 융합 키메라 리간드 FvGEL199가 분포되어 있음을 확인하였다.

3> <실시예 3> 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 (ScFv-GaLV Env GP) 키메라 리간드 발현 레트로바이러스의 표적세포 특이적 감염

34> <3-1> Tag-72 표면항원 발현 암세포주의 확인

35> Tag-72 항원 관련 세포주를 이용한 마우스 전이모델을 구축하기 위하여, 먼저 다양한 인간 암 세포주를 대상으로 Tag-72의 발현을 FACS 분석 (fluorescence-activated cell sorting analysis) 및 면역조직화학 분석 (immunohistochemical analysis)으로 조사하였다.

36> 먼저, FACS 분석으로 Tag-72 발현 암 세포주를 확인하였는데, 사람 결장암 세포주 LS174T (ATCC No. CL-188), 사람 유방암 세포주 MCF7 (KCLB No. 30022), 사

람 결장암 세포주 WiDr (ATCC No. CCL-218), 사람 유방암 세포주 MDA-MB231 (ATCC HTB-26) 및 사람 유방암 세포주 MDA-MB435 (ATCC HTB-129)를 대상으로 하였다. 여러 가지 인간 암 세포주들로부터 Tag-72의 발현을 확인하기 위하여 항 Tag-72 단일항체 CC49를 일차항체로 사용하였다 (Lee et al., *Mol. Immunol.*, 36: 61-71, 1999). 10^6 개의 다양한 암 세포주들을 항 Tag-72 일차항체와 4℃에서 30분간 반응시켰다. 냉각 PBA로 세 번 세척한 후 1:1,000 비율로 희석한 FITC가 결합된 항 마우스 IgG 이차항체 (Jackson Immuno Research사, 미국)로 4℃에서 30분간 반응시켰다. 냉각 PBA로 세 번 세척한 후 Facscan로 분석하였다 (도 7의 A). 그 결과, 사람 결장암 세포주 LS174T, 사람 유방암 세포주 MCF7은 Tag-72 표면항원 양성으로 나타난 반면, 사람 결장암 세포주 WiDr, 사람 유방암 세포주 MDA-MB231, 사람 유방암 세포주 MDA-MB435는 Tag-72 표면항원 음성으로 나타났다.

7> 이와 더불어 면역화학 염색방법을 이용하여 Tag-72 항원의 발현을 확인하였다. 면역화학 염색방법은 DAKO LSAB2 시스템과 알칼라인 포스파타아제 (alkaline phosphatase, #K674)를 이용하여 수행하였다. 일차항체로는 항 Tag-72 항체인 AKA (대한민국 특허 제318761호)를 1:1,000 비율로 희석하여 일차항체로 사용하였다. 상기 항 Tag-72 항체는 Tag-72에 대한 인간화 마우스 단일클론 항체 (humanized mouse monoclonal antibody raised against Tag-72)를 안정적으로 발현하는 차이나이즈 햄스터 난소 (Chinese hamster ovary, CHO; 대한민국 특허공개 제2003-13633호) 세포의 배양 상등액으로부터 하이트랩 단백질 A 컬럼 (Hytrap Protein A column, Amersham)을 사용하여 정제하여 준비하였다. 이차항체로는 인간 IgG H&L에 대한 바이오틴-염소 다중클론 항체 (ab6857-1, Abcam)를 1:1,000 비율로 희석하여 사용하였다. 또한, 배경 염색의 방지를 위해 라바미솔 (lavamisole, endogenous alkaline phosphatase inhibitor, >8021)을 용액에 첨가하여 사용하였다. 그 결과, 대장암 세포주 LS174T에서는

Tag-72 표면항원이 세포 표면에 전체적으로 분포되어 80 내지 90% 이상 대부분의 세포가 염색되었고, 유방암 세포주 MCF-7은 10 내지 20% 이내로 군데군데 염색되어 FACS 분석결과와 함께 이들이 Tag-72 발현 양성 세포주임을 확인할 수 있었다. 반면, 대장암 세포주 WiDr과 유방암 세포주 MDA-MB435와 MDA-MB231은 전혀 염색이 되지 않아 이들은 모두 Tag-72 음성 세포주임을 알 수 있었다 (도 7의 B).

8> <3-2> 표적세포 특이적 감염 확인

- 9> 상기 실시예 <2-1>에서 제조한 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 융합 키메라 리간드가 외피 막에 분포된 재조합 레트로바이러스로 상기 실시예 <2-2-1>에서 확인된 Tag-72 표면항원 양성 혹은 음성인 사람 암세포를 감염시키고, 이를 후 재조합 레트로바이러스에 의한 특이적 감염을 확인하기 위하여 전이벡터에 포함된 LacZ 유전자의 발현을 조사하였다.
- 10> 구체적으로, 포장세포주인 GP293을 6웰 플레이트에 3×10^5 세포/웰의 농도로 형질도입 하루 전에 분주한 후, 0.5 μ g씩의 야생형 GaLV 외피당단백질 발현벡터

pHEGEL와 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드 발현벡터 pHEFvGEL199를 각각 pMFG/lacZ/puro 0.5 μ g과 혼합하고 리포펙타민 플러스 (Invitrogen사, 미국)를 이용하여 세포에 형질도입하였다. 상기 웰 플레이트를 이틀 동안 37℃, 5% CO₂ 동물세포 배양기에서 배양하여 레트로바이러스가 생산된 상층액을 얻었다. 12웰 플레이트에 293, LS174T, MCF-7, MDA-MB231, MKN-75를 5×10⁴ 세포/웰씩 분주하고 24시간 경과 후 앞서 제조한 각각의 바이러스 상층액을 웰당 1 ml씩 8 μ g/ml 농도의 폴리브렌 (polybrene, Sigma)과 같이 표적세포에 감염시켰다. 감염시키고 4시간 경과 후, 새로운 배지로 교환하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 추가로 배양하였다. 배양이 끝나면, 세포 배양액을 제거하고 PBS로 세척한 후에 세포 고정액 (1% 포름알데히드, 0.2% 글루타르알데히드)으로 상온에서 10분간 고정하였다. 이를 PBS 완충용액으로 세 번 세척하고 X-gal 용액 (PBS, 0.2 M 칼륨 페로시아나이드 [potassium ferrocyanide], 0.2 M 칼륨 페리시아나이드 [potassium ferricyanide], 2.0 M MgCl₂, 40 mg/ml X-gal)으로 37℃에서 하룻밤 동안 염색하여 LacZ 유전자의 발현을 조사하였다.

1> 【표 2】

표적세포	레트로바이러스 벡터	
	야생형	ScFv-GaLV Env GP
293	2×10 ⁶	36
LS174T	6×10 ³	17
MCF-7	5×10 ⁴	121
MDA-MB435	9×10 ⁴	0
MDA-MB231	1.5×10 ⁵	0

- > 상기 표 2 및 도 8에 나타낸 바와 같이, 야생형 GaLV 외피당단백질 발현벡터 pHEGEL를 이용한 LacZ 유전자의 형질도입 결과, 293 세포주에서는 2×10^6 의 감염효율을, 암 세포주들인 MDA-MB435, MDA-MB231, MCF-7 세포주에서는 0.5 내지 1.5×10^5 정도의 감염효율을 보인 반면, LS174T 세포주에서는 6×10^3 정도로 낮은 감염효율을 보였다.
- > 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드 발현 재조합 레트로바이러스 벡터 pHEFvGEL199를 이용한 LacZ 유전자의 형질도입 결과, Tag-72 양성으로 확인된 MCF-7, LS174T 세포주와 더불어 293 세포주에서 LacZ 유전자의 발현을 확인할 수 있는 반면, Tag-72 음성인 MDA-MB435, MDA-MB231 세포주에서는 감염이 이루어지지 않았다. 특히, 293 세포주는 Tag-72 양성으로 확인된 문헌이 보고된 바 없으나 본 발명의 ScFv-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드에 의해 감염이 이루어진 것은 다른 세포주에 비해 감염 효율이 월등히 높기 때문에 나타나는 비 특이적 염색이거나 혹은 293 세포주에서도 Tag-72가 발현될 가능성이 존재하기 때문인 것으로 사료된다. 상기 결과로부터, 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드를 발현하는 재조합 발현벡터 pHEFvGEL199가 Tag-72 항원을 발현하는 세포에 특이적으로 결합하여 지표 유전자인 LacZ (β -갈락토시다제) 유전자를 표적세포에 성공적으로 전달하였음을 확인하였다.
- 14> MLV를 비롯한 다른 벡터의 경우에 키메라 리간드가 야생형 Env 보다 낮은 역가를 나타내는 것으로 보고된 바 있는데, 단향성 외피 (ecotropic Env)나 양향성 외피 (amphotropic Env)가 세포에 따라 10^5 내지 10^7 정도의 역가를 보이는 반면, 대부분의 단쇄항체-외피당단백질의 키메라 리간드는 표적 수용체에 따라 다소 차이는 있지만 $\sim 10^3$ 이하의 역가를 보여서 단쇄항체-외피당단백질의 키메라 리간드가 야생형 Env 보다 10^2 내지 10^4 정도로 낮은 역가를 나타내었다 (Chris A. Benedict. et al., *Human Gene Therapy* 10: 545-557, 1999; Mariana Marin. et al., *Journal of Virology* 70: 2957-2962, 1996; Te-Hua Tearina C. H. and Ralph Dornburg,

Journal of Virology 71: 720-725, 1997). 이는 외부 리간드가 외피당단백질에 삽입됨으로써 원래의 구조가 변형되어 바이러스의 감염성이 저하되기 때문이다. 일반적으로, 외피당단백질의 SU가 표적세포의 특정 수용체를 인지, 결합한 뒤 융합기능을 가진 막관통 (TM) 부위의 구조적인 변화 (conformational change)를 야기하여 바이러스가 감염되는데, 외부 리간드가 삽입되면 원래의 구조가 변형되어 SU로부터 TM으로의 구조적인 변화를 유도하는 신호의 전달이 파괴되어 바이러스가 숙주세포에 결합하여 내부로 유입되더라도 막의 융합이 일어나지 않아 바이러스 입자가 세포로 도입되지 못하게 되는 결합후 차단 (postbinding block)의 결과로 해석된다. 이러한 보고와 상기 결과로부터, 본 발명의 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드 FvGEL199가 지금까지 보고된 다른 레트로바이러스 벡터의 경우보다 높은 효율로 표적세포에 특이적으로 감염되어 전달하고자 하는 외부 유전자가 효과적으로 전달될 수 있음을 알 수 있다.

5> <실시예 4> 인체 암표적성 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드 발현 포장세포주의 제조

6> 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드 발현 재조합 발현벡터 pHEFvGEL199를 레트로 바이러스 Gag-Pol 단백질 발현 포장세포주인 GP293에 리포펙타민 (Invitrogen 사, 미국)을 사용하여 형질감염시킨 후 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 G418 (neomycine)을 14일 동안 처리하여 10개의 콜로니 (colony)를 선별한 후 각각 증식시켰다. 선별된 콜로니들에 β -갈락토시다제 유전자를 발현하는 레트로바이러스 벡터 pMFG/LacZ/puro (Oh et al.,

Mol. Cells 11: 192-197, 2001) 1 μg 을 형질도입시키고 48시간 후에 각각의 바이러스를 수확하였다. 이를 Tag-72 양성 세포주인 MCF-7 (KCLB 30022)에 감염시킨 후 형질도입 효율을 LacZ 유전자의 발현정도로 확인하였다. 이 중 가장 형질도입 효율이 높게 나타난 바이러스를 생산한 콜로니를 선택하여 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드가 지속적으로 생산되는 포장세포주 GP293HEFvGEL199라 명명하였다. 또한, 야생형의 GaLV Env를 갖는 pHEGEL 벡터 또한 상기와 동일한 방법으로 세포에 형질도입시키고 이로부터 클론을 선별·분리하여 야생형 GaLV Env를 발현하는 포장세포주 GP293HEGEL를 얻었다. 도 9는 상기 방법으로 구축한 GP293HEFvGEL199 및 GP293HEGEL 포장세포주에 LacZ 발현 레트로바이러스 벡터를 형질도입한 후 획득한 바이러스로 각 표적세포를 감염시킨 결과이다.

> <실시예 5> 인체 암표적성 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드 발현 레트로바이러스 생산세포주 제조

3> 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드 발현벡터 pHEFvGEL199를 β -갈락토시다제 유전자를 발현하는 레트로바이러스 벡터 pMFG/LacZ/puro (0.5 μg)와 함께 GP293 (3×10^5 /6웰) 세포에 리포펙타민을 사용하여 형질도입시킨 후 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 G418 (neomycine)과 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 퓨로마이신 (puromycin)을 연속으로 2주 동안 처리하여 8개의 콜로니를 선별하였다. 클론을 확장 배양하고 바이러스 함유 배양액을 수확한 후 MCF-7 세포에 이를 감염시켰다. 그 결과, 역가가 제일 높은 클론을 선별·배양하여 ScFv-GaLV Env 키메라 리간드가 외피막에 분포된 LacZ 발현 레트로바이러스를 지속적으로 생산하는 바이러스 생산세포주 GP293HEFvGEL199/lacZ를 구축하였다. 야생형의 GaLV Env를 갖는 pHEGEL 벡터 또한 상기와 동일한 방법으로 세포에 형질 도입시키고 이로부터 콜로니를 선별·분리하여 야생형 GaLV 외피를

갖는 LacZ 발현 레트로바이러스를 지속적으로 생산하는 바이러스 생산세포주 GP293HEGEL/lacZ를 구축하였다. 도 10은 상기 방법으로 구축한 GP293HEFvGEL199/lacZ 및 GP293HEGEL/lacZ 바이러스 생산세포주를 배양하여 획득한 바이러스로 각 표적세포를 감염시킨 결과이다.

· <실시예 6> Tag-72 항원 관련 세포주를 이용한 마우스 전이모델의 구축

· 상기 실시예 <3-1>에서 다양한 인체 암 세포주들을 사용하여 Tag-72의 발현을 FACS 방법과 면역조직화학 방법으로 조사한 결과, 인체 유방암 세포주 MCF-7, 대장암 세포주 LS174T가 양성으로 확인되었고, 인체 유방암 세포주 MDA-MB231, MDA-MB435와 대장암세포주 WIDR이 음성으로 확인되었다. Tag-72 음성 세포주의 폐로의 전이능은 MDA-MB231 세포주 보다는 MDA-MB435 세포주가 상대적으로 높기 때문에 (Lee & Welch, *Cancer Research* 57: 2384, 1997) MDA-MB435 세포주를 암전이 모델에 사용하였다. 또한, Tag-72 양성인 MCF-7 유방암 세포주는 폐로의 전이가 거의 일어나지 않아 생체내 실험에 사용하기가 어려운 반면, LS174T 대장암 세포주는 간으로의 전이 유도를 위한 신장주사 (intrasplenic injection) 방법 및 폐로의 전이 유도를 위한 정맥주사 (intravenous injection) 방법에 의해 전이가 유도되는 것으로 확인되어 LS174T 세포주를 MDA-MB435 세포주와 함께 암전이 동물모델의 구축에 사용하였다.

1> <6-1> 정맥주사를 이용한 대장암 전이모델 확립

2> Tag-72 양성인 LS174T 대장암 세포주와 Tag-72 음성인 MDA-MB435 유방암 세포주를 배양한 후 트립신-EDTA를 처리하여 세포를 수확하였고, 이를 무혈청 배지로 두 번 세척하였다. 세포의 수를 1×10^7 세포/㎖이 되도록 맞추고 PBS로 두 번 세척한 후 이를 6주령의 암컷 Balb/c

누드 마우스의 꼬리 정맥에 각각 1×10^6 세포 ($100 \mu\text{l}$ in PBS)씩 주사하였다. 6주 동안 마우스의 상태를 관찰한 뒤 수술을 통해 폐를 적출하여 4% 포르말린 용액으로 고정한 후, 폐에 형성된 전이덩어리를 확인하였다. 정맥주사를 통한 폐 전이능을 조사한 결과, LS174T 대장암 세포주에서는 평균 7.6개의 전이덩어리가 형성되었고, MDA-MB435 유방암 세포주에서는 이보다 1.6배 많은 12.2개의 전이덩어리가 형성되었음을 확인하였다 (도 11a 및 11b). 이에, 본 발명에서는 Tag-72 항원 특이적 암세포 적중 유전자 치료제의 동물시험 모델로 인체 대장암 세포주 LS174T의 폐 전이 모델을 사용하였다.

3> <6-2> 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드 발현 재조합 레트로바이러스 벡터를 이용한 생체내 형질도입 효율의 검증

4> 포장세포주인 GP293 세포를 6웰 플레이트에 웰당 3×10^5 세포로 분주하고 24시간 경과 후, 리포펙타민을 이용하여 단쇄항체-GaLV 외피당단백질 키메라 리간드 발현벡터 pHEFvGEL199와 β -갈락토시다제 유전자를 발현하는 레트로바이러스 벡터 pMFG/LacZ/puro를 형질도입시키고 2일 동안 37°C , 5% CO_2 동물세포 배양기에서 배양하여 바이러스 생산세포주를 얻었다. 그런 다음, 배양된 LS174T 세포 (1×10^6 세포/ $50 \mu\text{l}$ in PBS)와 MDA-MB435 세포 (1×10^6 세포/ $50 \mu\text{l}$ in PBS)를 각각 6 주령의 암컷 Balb/c 누드 마우스의 꼬리 정맥 (tail vein)에 1×10^6 세포 ($100 \mu\text{l}$ in PBS)씩 주사한 직후, 바이러스 생산세포주 (1×10^6 세포/ $50 \mu\text{l}$ in PBS)를 동일한 방법으로 주사하였다. 이 후, 3일 간격으로 바이러스 생산세포주 (1×10^6 세포 in $100 \mu\text{l}$ 의 PBS)를 6주 동안 각각의 마우스에 정맥 주사하였다. 6주 경과 후, 마우스를 회

생시키고 폐를 적출한 다음 고정액에 담아 조직을 고정하였고, X-gal 염색을 수행하여 생체 내에서의 형질도입 효율을 조사하였다.

> 그 결과, Tag-72 양성 세포주인 LS174T를 정맥 주사하여 폐에 전이덩어리가 형성된 경우에 ScFv-GaLV Env GP 키메라 리간드를 매개로 한 리포터 유전자 LacZ의 형질도입은 37.8% 정도로 매우 효율적이었고 Tag-72 특이적으로 이루어지는 것을 확인하였다. 반면, Tag-72 음성 세포주인 MDA-MB435 세포에 의해 형성된 전이덩어리에는 9.77% 정도의 염색된 전이덩어리를 확인할 수 있었다. 이로부터, 본 발명의 ScFv-GaLV Env GP 키메라 리간드 발현벡터에 의한 표적 특이적 유전자 전달 시스템이 Tag-72 항원 특이적이면서, 매우 효율적으로 형질도입이 이루어진다는 사실을 확인하였다. 도 12a는 전이덩어리가 형성된 폐 조직과 ScFv-GaLV Env 키메라 리간드 발현 재조합 레트로바이러스 벡터를 이용한 LacZ (β -갈락토시다제) 유전자의 도입, 발현으로 염색되어진 전이덩어리를 해부현미경으로 촬영한 사진이다. 또한, 하기 표 3은 각각의 마우스에서 적출한 폐에서의 전이덩어리 갯수와 염색된 전이덩어리의 갯수를 나타낸 것이고, 이를 백분율(%)로 환산하여 그래프로 표시하였다 (도 12b).

>

【표 3】

마우스	LS174T/ScFv-Env/LacZ			MDA-MB435/ScFv-Env/LacZ		
	전이당어리	염색	형질도입 효율 (%)	전이당어리	염색	형질도입 효율 (%)
1	5	2	40	8	0	0
2	3	1	33	6	1	16.7
3	6	2	33	6	0	0
4	2	1	50	3	0	0
5	7	2	29	7	0	0
6	2	0	0	4	1	25
7	3	2	67	12	2	16.7
8	40	4	40	11	2	18.2
9	11	3	28	15	0	0
10	12	7	58	19	4	21.1
평균	6.1	2.4	37.8	9.1	1	9.77

【발명의 효과】

- 7> 상기에서 살펴본 바와 같이, 종양 관련 당단백질 Tag-72 표면항원에 특이적인 단쇄항체와 GaLV 외피당단백질이 융합된 본 발명의 키메라 리간드는 Tag-72를 발현하는 종양세포에 대해 형질도입 효율이 매우 높고, 표적세포에 특이적으로 감염되어 치료 유전자를 효과적으로 전달할 수 있으므로 암의 성장 및 전이 억제를 위한 유전자 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

종양 관련 당단백질 Tag-72 표면항원에 특이적인 단쇄항체 (ScFv)와 GaLV 외피당단백질이 융합된 키메라 리간드 단백질.

【청구항 2】

제 1항에 있어서,

단쇄항체 (ScFv)가 GaLV 외피당단백질의 표면 서브유닛 부위 내 199번째 및 200번째 아미노산 사이에 삽입되는 것을 특징으로 하는 키메라 리간드 단백질.

【청구항 3】

제 1항에 있어서,

서열번호 9로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 키메라 리간드 단백질

【청구항 4】

제 1항의 키메라 리간드 단백질을 암호화하는 유전자.

【청구항 5】

제 4항에 있어서.

서열번호 8로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 유전자.

【청구항 6】

제 4항의 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

【청구항 7】

제 6항에 있어서,

pHEFvGEL199 또는 pMEFvGEL199인 재조합 발현벡터.

【청구항 8】

제 6항의 재조합발현벡터에 의해 형질도입된 포장세포주.

【청구항 9】

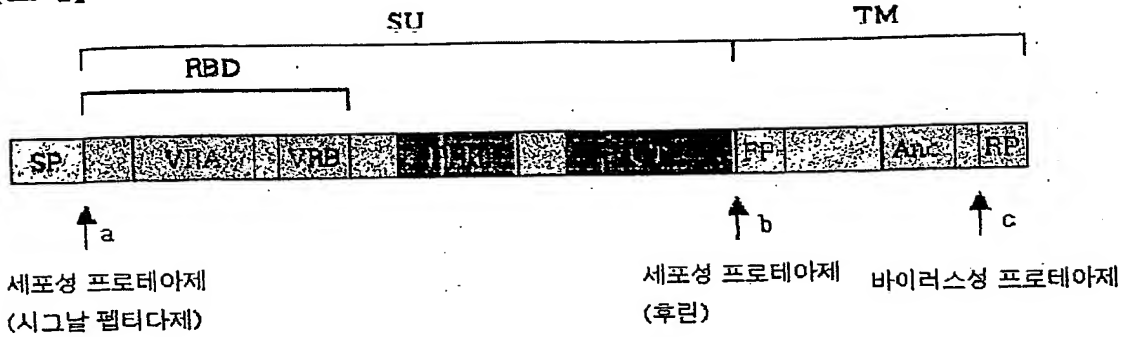
제 8항의 포장세포주로부터 생산된, 제 1항의 키메릭 리간드 단백질이 외피막에 분포된 재조합 레트로바이러스.

【청구항 10】

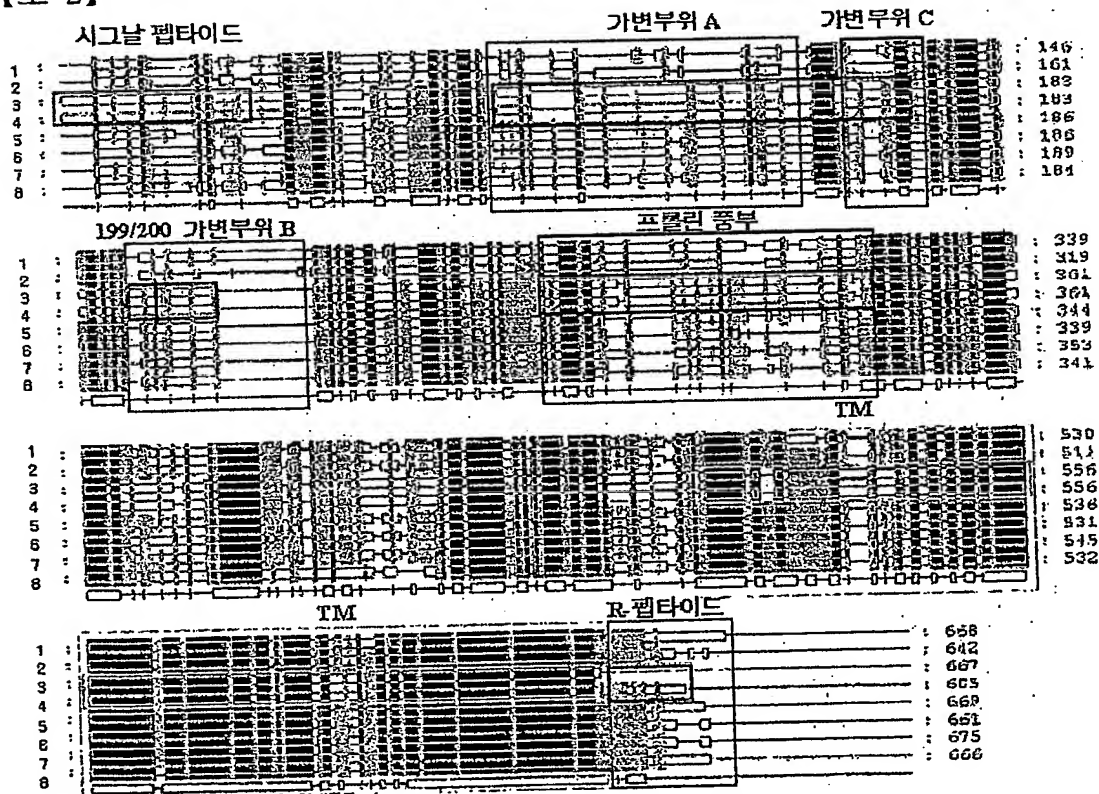
제 1항의 키메릭 리간드 단백질 또는 제 8항의 포장세포주를 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 항암제 조성물.

【도면】

【도 1】

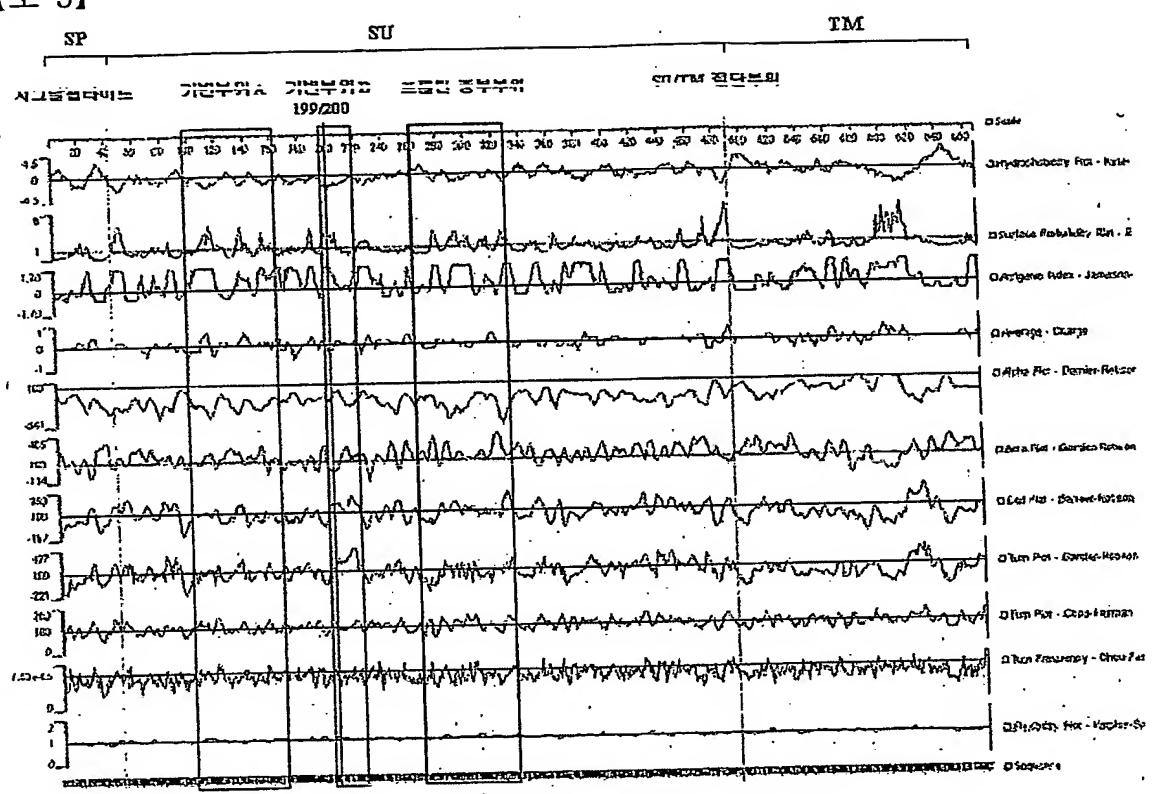


【도 2】

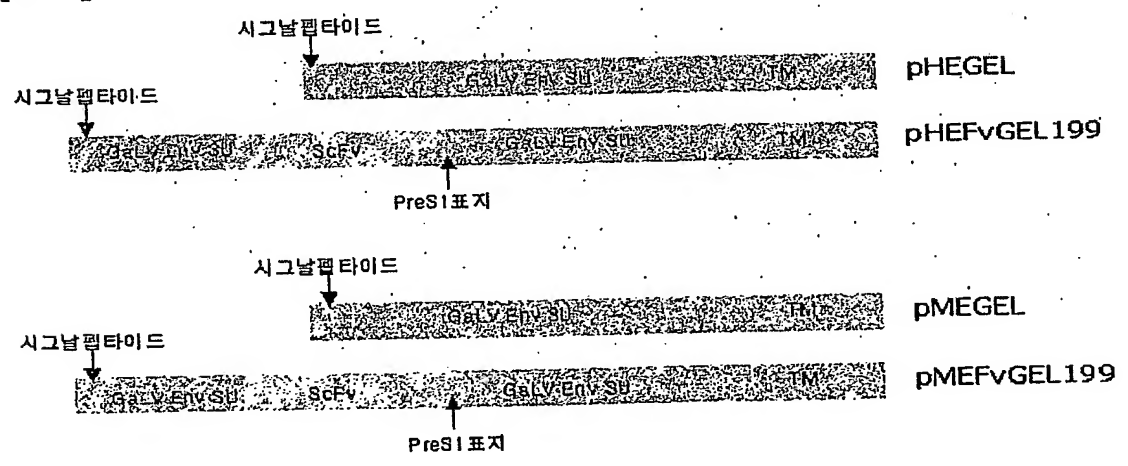


- 1.: 프렌드 류케미아 프로바이러스 (물론 CFE-6)
- 2.: 뎀 린 류케미아 바이러스 (세 포 주 A/Glasgow-1)
- 3.: 긴팔원숭이 (Gibbon ape) 류케미아 바이러스
- 4.: 긴팔원숭이 류케미아 바이러스 (SEATO)
- 5.: AKV 유린 류케미아 바이러스.
- 6.: Cas-Br-E 유린 류케미아 바이러스
- 7.: 프렌드 유린 류케미아 바이러스 (준리주 57) (Fr-MuLV)
- 8.: HoMuLV 유린 류케미아 바이러스 (Mus 호르둘라누스 바이러스)

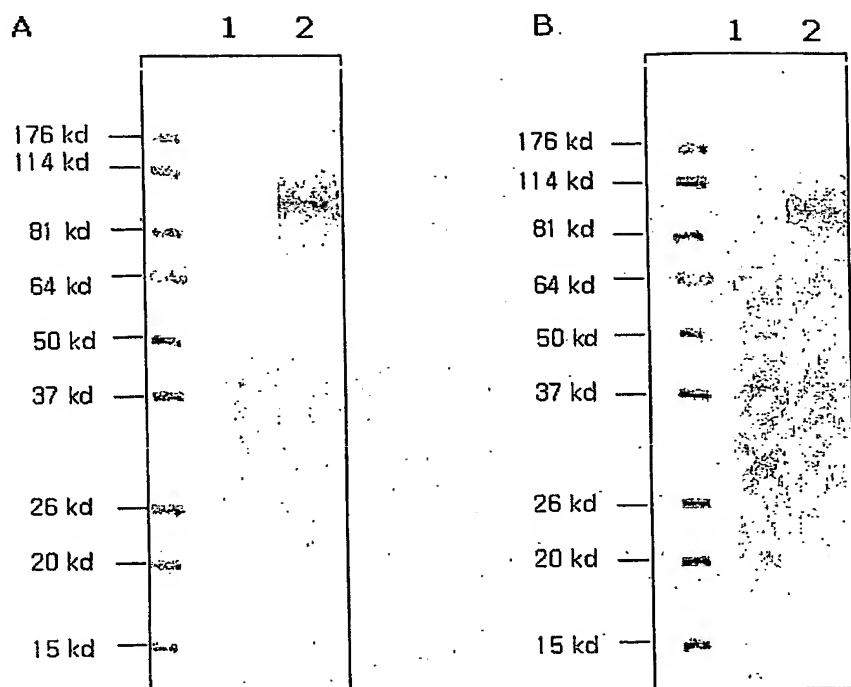
【도 3】



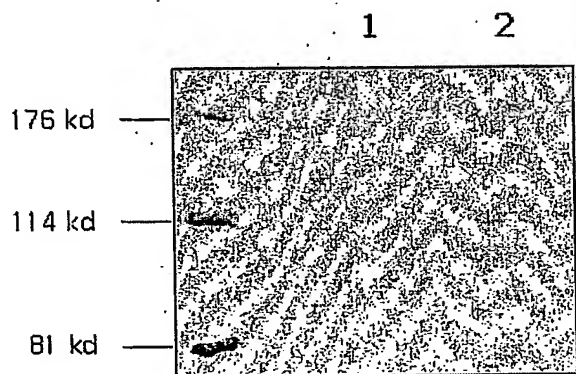
【도 4】



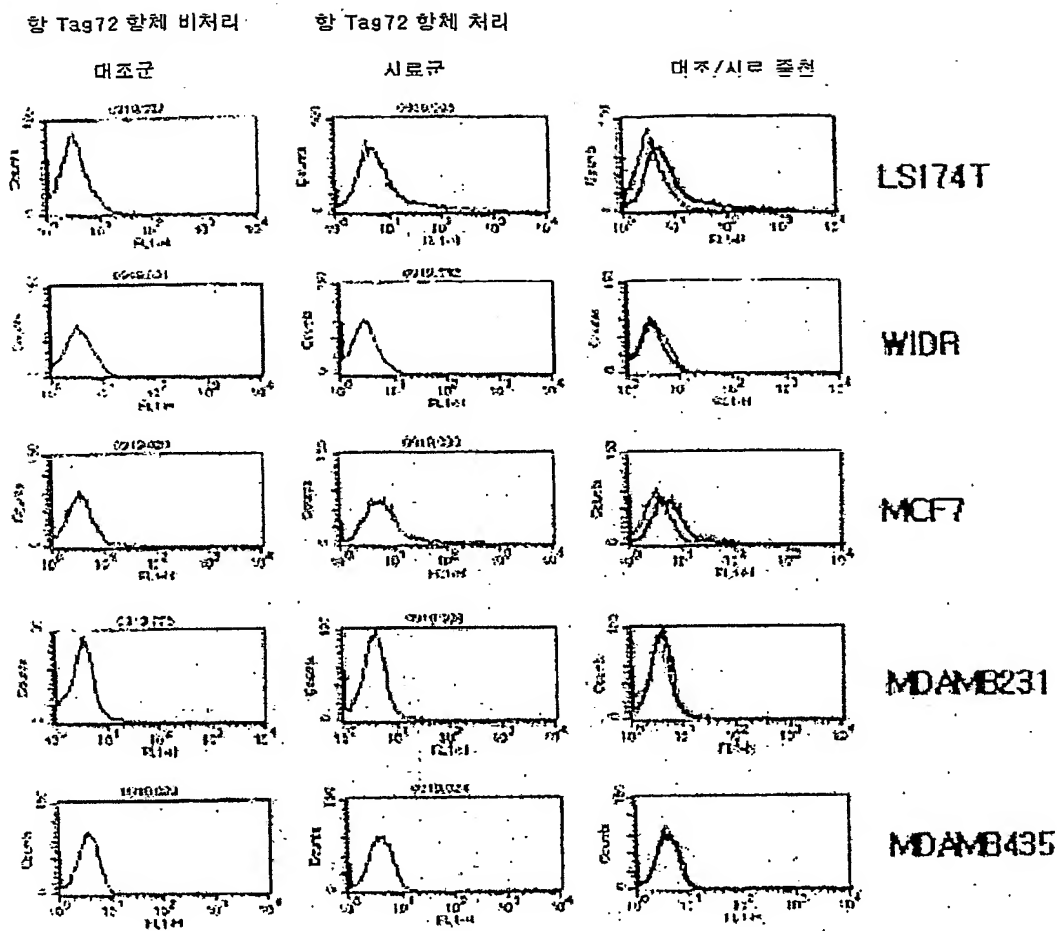
【도 5】



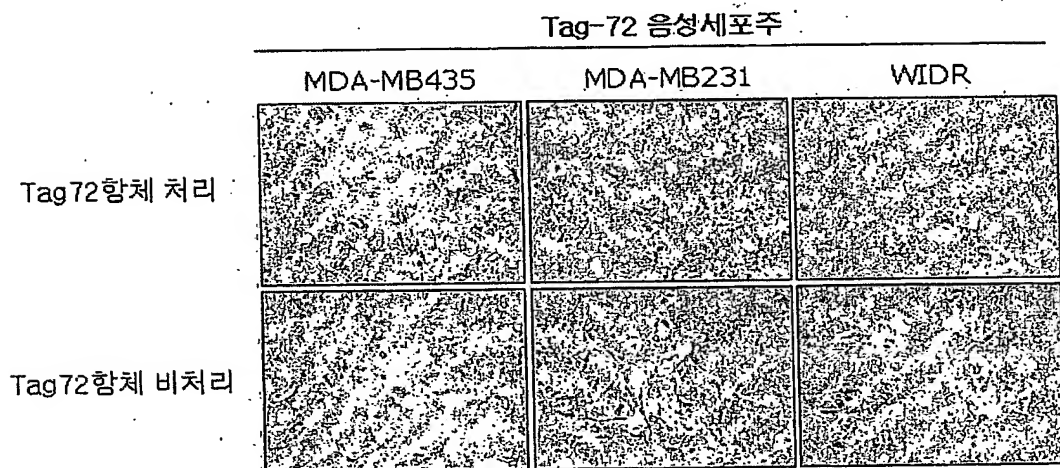
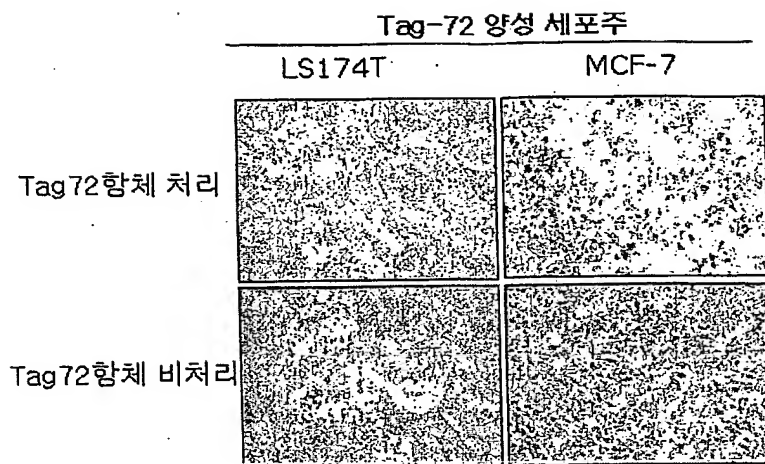
【도 6】



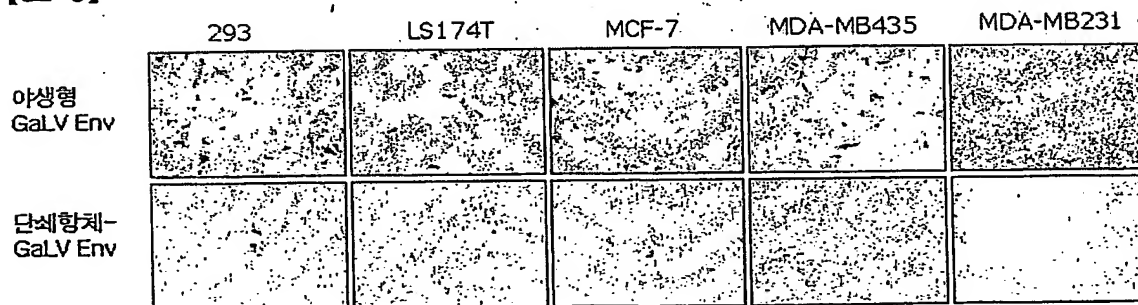
【도 7a】



【도 7b】

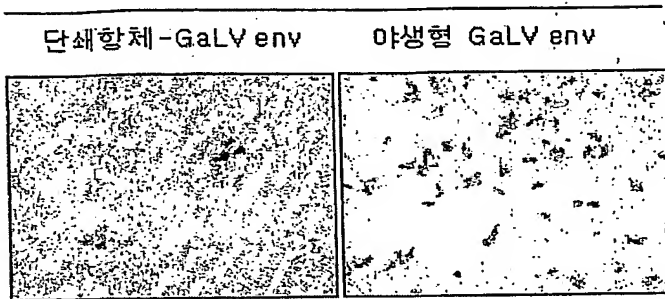


【도 8】



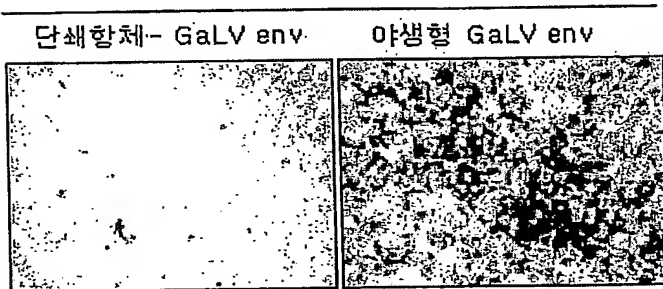
【도 9】

각 포장세포주에서 생산한
바이러스로 표적세포 감염

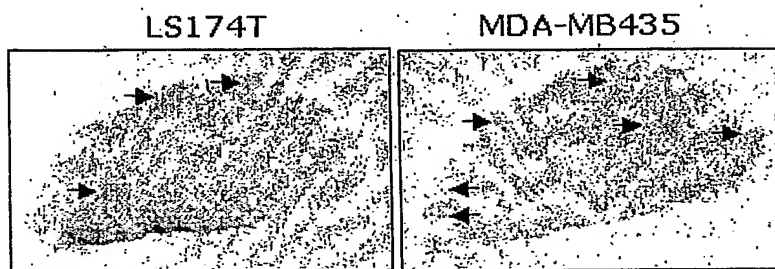


【도 10】

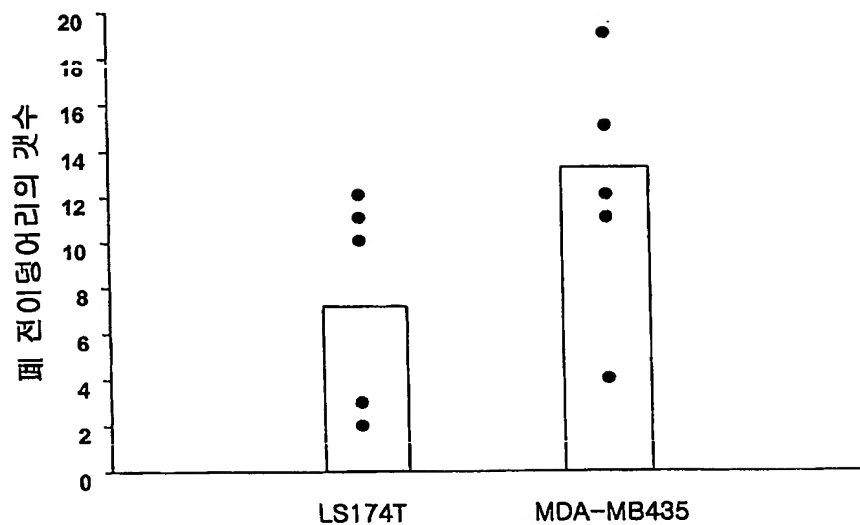
각 바이러스생산세포주에서 생산한
바이러스로 표적세포 감염



【도 11a】



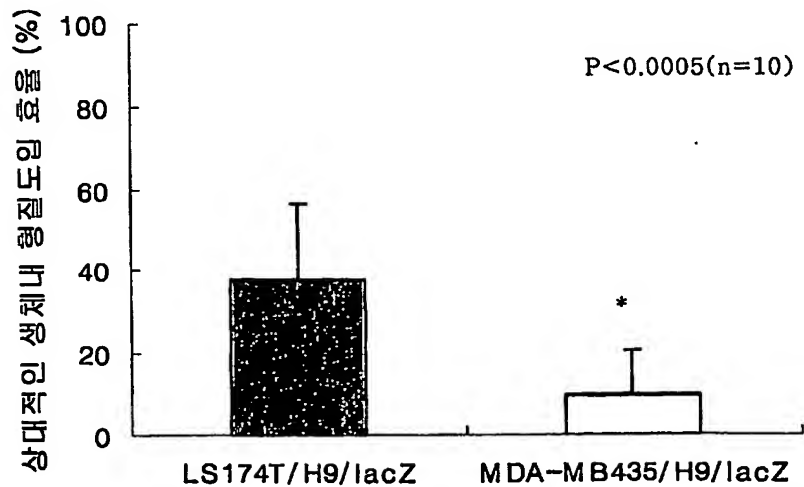
【도 11b】



【도 12a】



【도 12b】



【서열목록】

<110> INJE UNIVERSITY <120> CANCER CELL TARGETING GENE DELIVERY METHOD <160>
 11 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 36 <212> DNA <213> Artificial
 Sequence <220> <223> Env F primer <400> 1 cgcgatccg aattccatac ctggtgtgc
 tgacta 36 <210> 2 <211> 47 <212> DNA <213>
 Artificial Sequence <220> <223> 597LN primer <400> 2 agctggacct ggctgccacc
 acctccgcta ttttggctccc attttac 47 <210> 3 <211> 49 <212>
 DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> LC597 primer <400> 3 caaccccgcc
 gcaggtggag gaggcagtga atggactcaa aaatttcaa 49 <210> 4 <211>
 35 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Spike R2 primer <400>
 4 tgctctagaa ttcttaaagg ttaccttcgt tctct 35 <210>
 5 <211> 36 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> LnkNScFv
 primer <400> 5 ggaggtgggtg gcagccaggt ccagctagtgc cagtct
 36 <210> 6 <211> 36 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 ScFvLnkC primer <400> 6 actgcctcct ccacctgcgg cggggttgaa gtccca
 36 <210> 7 <211> 2058 <212> DNA <213> SEATO type of GaLV Env glycoprotein
 <220> <221> sig_peptide <222> (1)..(126) <220> <221> misc_feature <222>
 (127)..(1467) <223> surface subunit region <220> <221> misc_feature <222>
 (1468)..(2025) <223> transmembrane domain <400> 7 atggtattgc tgcctgggtc
 catgcttctc acctcaaacc tgcaccacct tcggcaccag 60 atgagtcctg ggagctggaa

aagactgatac atcctcttaa gctgcgtatt cggcggcggc
gaacccccac cagcccatga ccttcacttg gcaggtactg
ctgggataca aaggcagtc agcccccttg gacttgggtg
atgtgccttg gcggctagtc ttgagtcctg ggatatcccg
taaacgagtc agacctccgg actcagacta tactgccgct
agccataggg tgcagctiacc ctcgggctag gactagaatg
atgtccccgg gatggccgga ccctttcaga agctagaagg
atactgtaaa gaatgggatt gtgagaccac ggggaccggt
aaaagacctc ataactgtaa aatgggacca aaatagcgaa
gtgtcaccag accggctggg gtaacccct taaaatagat
atccaaggac tggataacgg gaaaaacctg gggattaaga
aggcgtacag ttcaccattc gcttaaaaat caccaacatg
tgacctcgtc cttgtggaac aaggacctcc tagaacgtcc
tcccccaagg gaagcgccac cgccatctct ccccgactct
tagtgcacaa actcccacgg tgagaaaaac aattgttacc
cacaggcgac agactttttg atcttgtgca gggggccttc
cccagggggc actgagtctt gctggctttg tttggccatg
aatagcctca tcaggagagg tcgcctactc caccgacctt
ccaaggaaaag ctaccctca ctgaggtctc aggacacggg
ctttacccat cagcatctct gcaatcagac cctatccatc
gtatctgctc ccctccaacc atagctgggtg ggcttgcagc

120 gggacgagtc tgcaaaataa
180 tcccaaactg gagacgttgt
240 cccacactta aacctgatgt
300 ggaaccgatg tctcgtcctc
360 tataagcaaa tcacctgggg
420 gcaagctcta ctttctacgt
480 tgcggggggc tagaatccct
540 tattggctat ctaaatcctc
600 tggactcaaa aatttcaaca
660 ttcacagaca aaggaaaatt
720 ttctatgtgt ctggacatcc
780 ccagctgtgg cagtaggtcc
840 ctcgctctcc cacctcctct
900 aactccacag ccctggcgac
960 ctaaacactc cgcctcccac
1020 ctaaccttaa atgctaccaa
1080 ggccccctt attatgaagc
1140 gaccgggtgcc gctgggggac
1200 ttgtgcatag gaaaggtgcc
1260 aattcctccg gagaccatca
1320 actggcctca cccttgcct

ctccacctca gtttttaatc agactagaga tttctgtatc	1380 caggtccagc tgattcctcg
catctattac tatcctgaag aagttttgtt acaggcctat	1440 gacaattctc accccaggac
taaaagagag gctgtctcac ttaccctagc tgttttactg	1500 gggttgggaa tcacggcggg
aataggtact ggttcaactg ccttaattaa aggacctata	1560 gacctccagc aaggcctgac
aagcctccag atcgccatag atgctgacct ccgggccctc	1620 caagactcag tcagcaagtt
agaggactca ctgacttccc tgtccgaggt agtgctccaa	1680 aataggagag gccttgactt
gctgttttcta aaagaaggig gcctctgtgc ggccctaaag	1740 gaagagtgtc gtttttacat
agaccactca ggtgcagtac gggactccat gaaaaaactc	1800 aaagaaaaac tggataaaaag
acagttagag cgccagaaaa gccaaaactg gtatgaagga	1860 tggttcaata actccccttg
gttcactacc ctgctatcaa ccatcgctgg gccctatta	1920 ctctccttc tgttgctcat
cctcgggcca tgcatcatca ataagttagt tcaattcatc	1980 aatgatagga taagtgcagt
taaaattctg gtccttagac aaaaatatca ggccctagag	2040 aacgaaggta acctttaa
2058 <210> 8 <211> 786 <212> DNA <213> Tag-72pS1 <220> <221>	
misc_feature <222> (346)..(390) <223> (Gly4Ser)3 linker <220> <221>	
misc_feature <222> (739)..(777) <223> PreS1 Tag <400> 8 caggtccagc	
tagtgcagtc tggggctgaa gtgaagaagc ctggggcttc agtgaaggtg	60 tcctgcaagg
cttctggcta caccttcact gaccatgcaa ttactgggt gcgccaggcc	120 cctggacaac
gccttgagtg gatgggatat tttctcctg gcaacgatga ttttaaatac	180 tcccagaagt
tccagggacg cgtgacaatc actgcagaca aatccgcgag cacagcctac	240 atggagctga
gcagcctgag atctgaggac acggcgggtct attactgtgc aagatcgttg	300 aacatggcat
actggggcca agggactctg gtcactgtct cttcaggtgg aggcggttca	360 ggcggaggtg

gctctggcgg tggcggatcg gacattgtga tgacccagtc tccagactcc 420 ctggctgtgt
 ctctgggcga gagggccacc atcaactgca agtccagcca gagtgtttta 480 tacagcagca
 acaataagaa ctacttagct tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct 540 aagctgctca
 tttactgggc atctaccgga gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc 600 agcgggtctg
 ggacagattt cactctcacc atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca 660 gtttattact
 gtcagcaata ttattcctat ccgttgacgt tccggccaagg gaccaaggtg 720 gaaatcaaag
 cggccgcagg agccaacgca aacaatccag attgggactt caaccccgcc 780 gcatag

786 <210> 9 <211> 13 <212> PRT <213> PreS1 epitope at C-terminal of
 Tag-72pS1 <400> 9 Gly Ala Asn Ala Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro 1

5 10 <210> 10 <211> 2871 <212> DNA <213>
 Artificial Sequence <220> <223> ScFv-GaLV Env GP chimeric peptide (FvGEL199) DNA
 <400> 10 atggtattgc tgcctgggtc catgcttctc acctcaaacc tgcaccacct tcggcaccag
 60 atgagtcctg ggagctggaa aagactgac atcctcttaa gctgcgtatt cggcggcggc 120
 gggacgagtc tgcaaaataa gaacccccac cagcccatga ccctcacttg gcaggtactg 180
 tcccaaactg gagacgttgt ctgggataca aaggcagtcc agcccccttg gacttggtgg 240
 cccacactta aacctgatgt atgtgccttg gcggctagtc ttgagtcctg ggatatcccg 300
 ggaaccgatg tctcgtcctc taaacgagtc agacctccgg actcagacta tactgccgct 360
 tataagcaaa tcacctgggg agccataggg tgcagctacc ctccgggctag gactagaatg 420
 gcaagctcta ctttctacgt atgtccccgg gatggccgga ccctttcaga agctagaagg 480
 tgcggggggc tagaatccct atactgtaaa gaatgggatt gtgagaccac ggggaccggt 540
 tattggctat ctaaatcctc aaaagacctc ataactgtaa aatgggacca aaatagcgga 600

ggtgggtggca gccagggtcca gctagtgag tctggggctg aagtgaagaa gcctggggct	660
tcagtgaagg tgcctgcaa ggcttctggc tacaccttca ctgacctgc aattcactgg	720
gtgcgccagg cccctggaca acgccttgag tggatgggat attttctcc tggcaacgat	780
gattttaaat actcccagaa gttccaggga cgcgtgacaa tctctgcaga caaatccgcg	840
agcacagcct acatggagct gagcagcctg agatctgagg acacggcggg ctattactgt	900
gcaagatcgt tgaacatggc atactggggc caagggactc tggctactgt ctcttcagg	960
ggaggcgggt caggcggagg tggctctggc ggtggcggat cggacattgt gatgaccag	1020
tctccagact ccctggctgt gtctctgggc gagagggcc ccatcaactg caagtccagc	1080
cagagtgttt tatacagcag caacaataag aactacttag ctgtgtacca gcagaaacca	1140
ggacagcctc ctaagctgct catttactgg gcatctaccc gggaatccgg ggtccctgac	1200
cgattcagtg gcagcgggtc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcaggct	1260
gaagatgtgg cagtttatta ctgtcagcaa tattattcct atccgttgac gttcggccaa	1320
gggaccaagg tggaatcaa agcggccgca ggagccaacg caaacaatcc agattgggac	1380
ttcaaccccg ccgcaggtgg aggaggcagt gaatggactc aaaaatttca acagtgtcac	1440
cagaccggct ggtgtaaccc ccttaaaata gatttcacag acaaaggaaa attatccaag	1500
gactggataa cgggaaaaac ctggggatta agattctatg tgtctggaca tccaggcgta	1560
cagttcacca ttgccttaaa aatcaccaac atgccagctg tggcagtagg tcctgacctc	1620
gtccttgttg aacaaggacc tcctagaacg tccctcgctc tcccacctcc tcttccccca	1680
agggaagcgc caccgccatc tctccccgac tctaactcca cagccctggc gactagtgca	1740
caaactcca cgggtgagaaa aacaattgtt accctaaaca ctccgcctcc caccacaggc	1800
gacagacttt ttgatcttgt gcagggggcc ttctaacct taaatgctac caaccaggg	1860

gccactgagt cttgctggct ttgtttggcc atgggcccc cttattatga agcaatagcc 1920
 tcatcaggag aggtcgcta ctccaccgac ctgaccggt gccgctgggg gacccaagga 1980
 aagtcaccc tcaactgaggt ctcaggacac gggttgtgca taggaaaggt gccctttacc 2040
 catcagcatc tctgcaatca gaccctatcc atcaattcct ccggagacca tcagtatctg 2100
 ctcccctcca accatagctg gtgggcttgc agcactggcc tcacccttg cctctccacc 2160
 tcagttttta atcagactag agatttctgt atccaggctc agctgattcc tcgcatctat 2220
 tactatcctg aagaagtttt gttacaggcc tatgacaatt ctaccccag gactaaaaga 2280
 gaggctgtct cacttaccct agctgtttta ctggggttgg gaatcacggc gggaataggt 2340
 actggttcaa ctgccttaat taaaggacct atagacctcc agcaaggcct gacaagcctc 2400
 cagatcgcca tagatgctga cctccgggcc ctccaagact cagtcagcaa gttagaggac 2460
 tcactgactt ccctgtccga ggtagtgctc caaaatagga gaggccttga cttgctgttt 2520
 ctaaaagaag gtggcctctg tgcggcccta aaggaagagt gctgttttta catagaccac 2580
 tcaggtgcag tacgggactc catgaaaaaa ctcaaagaaa aactggataa aagacagtta 2640
 gagcgccaga aaagccaaaa ctggtatgaa ggatggttca ataactcccc ttggttact 2700
 accctgctat caaccatcgc tgggcccta ttactcctcc ttctgttgct catcctcggg 2760
 ccatgcatca tcaataagtt agttcaattc atcaatgata ggataagtgc agttaaatt 2820
 ctggtcctta gacaaaata tcaggcccta gagaacgaag gtaaccttta a 2871 <210>

11 <211> 956 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223> ScFv-GaLV
 Env GP chimeric ligand (FvGEL199) <400> 11 Met Val Leu Leu Pro Gly Ser Met Leu Leu
 Thr Ser Asn Leu His His 1 5 10 15
 Leu Arg His Gln Met Ser Pro Gly Ser Trp Lys Arg Leu Ile Ile Leu 20

25 30 Leu Ser Cys Val Phe Gly Gly Gly Gly Thr Ser Leu Gln Asn Lys
 Asn 35 40 45 Pro His Gln Pro Met Thr Leu
 Thr Trp Gln Val Leu Ser Gln Thr Gly 50 55 60
 Asp Val Val Trp Asp Thr Lys Ala Val Gln Pro Pro Trp Thr Trp Trp 65
 70 75 80 Pro Thr Leu Lys Pro Asp Val Cys Ala Leu
 Ala Ala Ser Leu Glu Ser 85 90 95
 Trp Asp Ile Pro Gly Thr Asp Val Ser Ser Ser Lys Arg Val Arg Pro 100
 105 110 Pro Asp Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Tyr Lys Gln Ile Thr Trp Gly
 Ala 115 120 125 Ile Gly Cys Ser Tyr Pro Arg
 Ala Arg Thr Arg Met Ala Ser Ser Thr 130 135 140
 Phe Tyr Val Cys Pro Arg Asp Gly Arg Thr Leu Ser Glu Ala Arg Arg 145
 150 155 160 Cys Gly Gly Leu Glu Ser Leu Tyr Cys Lys
 Glu Trp Asp Cys Glu Thr 165 170 175
 Thr Gly Thr Gly Tyr Trp Leu Ser Lys Ser Ser Lys Asp Leu Ile Thr 180
 185 190 Val Lys Trp Asp Gln Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln
 Leu 195 200 205 Val Gln Ser Gly Ala Glu Val
 Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val 210 215 220
 Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His Ala Ile His Trp 225
 230 235 240 Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu
 Trp Met Gly Tyr Phe Ser 245 250 255
 Pro Gly Asn Asp Asp Phe Lys Tyr Ser Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val 260

265 270 Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu
 Ser 275 280 285 Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr
 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Leu 290 295 300
 Asp Met Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly 305
 310 315 320 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 Gly Gly Gly Ser Asp Ile 325 330 335
 Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg 340
 345 350 Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser
 Asn 355 360 365 Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp
 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro 370 375 380
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp 385
 390 395 400 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser 405 410 415
 Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr 420
 425 430 Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 Ala 435 440 445 Ala Ala Gly Ala Asn Ala Asn
 Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Ala 450 455 460
 Ala Gly Gly Gly Gly Ser Glu Trp Thr Gln Lys Phe Gln Gln Cys His 465
 470 475 480 Gln Thr Gly Trp Cys Asn Pro Leu Lys Ile
 Asp Phe Thr Asp Lys Gly 485 490 495
 Lys Leu Ser Lys Asp Trp Ile Thr Gly Lys Thr Trp Gly Leu Arg Phe 500

505 510 Tyr Val Ser Gly His Pro Gly Val Gln Phe Thr Ile Arg Leu Lys
 Ile 515 520 525 Thr Asn Met Pro Ala Val Ala
 Val Gly Pro Asp Leu Val Leu Val Glu 530 535 540
 Gln Gly Pro Pro Arg Thr Ser Leu Ala Leu Pro Pro Pro Leu Pro Pro 545
 550 555 560 Arg Glu Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Asp
 Ser Asn Ser Thr Ala Leu 565 570 575
 Ala Thr Ser Ala Gln Thr Pro Thr Val Arg Lys Thr Ile Val Thr Leu 580
 585 590 Asn Thr Pro Pro Pro Thr Thr Gly Asp Arg Leu Phe Asp Leu Val
 Gln 595 600 605 Gly Ala Phe Leu Thr Leu Asn
 Ala Thr Asn Pro Gly Ala Thr Glu Ser 610 615 620
 Cys Trp Leu Cys Leu Ala Met Gly Pro Pro Tyr Tyr Glu Ala Ile Ala 625
 630 635 640 Ser Ser Gly Glu Val Ala Tyr Ser Thr Asp
 Leu Asp Arg Cys Arg Trp 645 650 655
 Gly Thr Gln Gly Lys Leu Thr Leu Thr Glu Val Ser Gly His Gly Leu 660
 665 670 Cys Ile Gly Lys Val Pro Phe Thr His Gln His Leu Cys Asn Gln
 Thr 675 680 685 Leu Ser Ile Asn Ser Ser Gly
 Asp His Gln Tyr Leu Leu Pro Ser Asn 690 695 700
 His Ser Trp Trp Ala Cys Ser Thr Gly Leu Thr Pro Cys Leu Ser Thr 705
 710 715 720 Ser Val Phe Asn Gln Thr Arg Asp Phe Cys
 Ile Gln Val Gln Leu Ile 725 730 735
 Pro Arg Ile Tyr Tyr Tyr Pro Glu Glu Val Leu Leu Gln Ala Tyr Asp 740

745 750 Asn Ser His Pro Arg Thr Lys Arg Glu Ala Val Ser Leu Thr Leu
 Ala 755 760 765 Val Leu Leu Gly Leu Gly Ile
 Thr Ala Gly Ile Gly Thr Gly Ser Thr 770 775 780
 Ala Leu Ile Lys Gly Pro Ile Asp Leu Gln Gln Gly Leu Thr Ser Leu 785
 790 795 800 Gln Ile Ala Ile Asp Ala Asp Leu Arg Ala
 Leu Gln Asp Ser Val Ser 805 810 815
 Lys Leu Glu Asp Ser Leu Thr Ser Leu Ser Glu Val Val Leu Gln Asn 820
 825 830 Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Phe Leu Lys Glu Gly Gly Leu Cys
 Ala 835 840 845 Ala Leu Lys Glu Glu Cys Cys
 Phe Tyr Ile Asp His Ser Gly Ala Val 850 855 860
 Arg Asp Ser Met Lys Lys Leu Lys Glu Lys Leu Asp Lys Arg Gln Leu 865
 870 875 880 Glu Arg Gln Lys Ser Gln Asn Trp Tyr Glu
 Gly Trp Phe Asn Asn Ser 885 890 895
 Pro Trp Phe Thr Thr Leu Leu Ser Thr Ile Ala Gly Pro Leu Leu Leu 900
 905 910 Leu Leu Leu Leu Leu Ile Leu Gly Pro Cys Ile Ile Asn Lys Leu
 Val 915 920 925 Gln Phe Ile Asn Asp Arg Ile
 Ser Ala Val Lys Ile Leu Val Leu Arg 930 935 940
 Gln Lys Tyr Gln Ala Leu Glu Asn Glu Gly Asn Leu 945 950
 955

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.